



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LIN7A EN CÉLULAS PRESENTADORAS  
DE ANTÍGENO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**DONATTO SALCEDO MÁRQUEZ**

**ASESORA DEL TEMA: DRA. MARÍA TERESA SANTOS MENDOZA**

**SUPERVISOR TÉCNICO: DR. JORGE ROSAS GARCÍA**

**Ciudad Universitaria, CD. MX.**

**2023**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: HERAS CHAVARRÍA MÓNICA BERENICE

**VOCAL:** Profesor: MANCILLA HERRERA ISMAEL

**SECRETARIO:** Profesor: SANTOS MENDOZA MARÍA TERESA

**1er. SUPLENTE:** Profesor: GUTIÉRREZ VENEGAS GLORIA

**2° SUPLENTE:** Profesor: DE LEÓN LARA ENRIQUE

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO DE TRANSCRIPTÓMICA E INMUNOLOGÍA MOLECULAR  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS  
ISMAEL COSÍO VILLEGAS

**ASESORA DEL TEMA:**

Dra. María Teresa Santos Mendoza



**SUPERVISOR TÉCNICO:**

Dr. Jorge Rosas García



**SUSTENTANTE:**

Donatto Salcedo Márquez





7.3 Evaluación de la localización subcelular de las proteínas por Inmunofluorescencia (IF)	31
7.3.1 Tratamiento de cubreobjetos con poli-DL-lisina y adhesión de DC	31
7.3.2 Fijación de las muestras de DC y MA	31
7.3.3 Inmunofluorescencia	32
8. Resultados	33
8.1 Cambio en la expresión de Lin7A en DC	33
8.2 Cambio en la expresión de Lin7A en MA	37
8.3 Titulación del anticuerpo para Inmunofluorescencia	40
8.4 Localización subcelular de Lin7A en DC	42
8.5 Localización subcelular de Lin7A en MA	43
9. Discusión	46
10. Conclusiones	53
11. Referencias	54
12. Anexo I   Disoluciones	66
13. Anexo II   Reactivos utilizados para las disoluciones	70

## 1. Abreviaturas y acrónimos

aa	Aminoácido
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CASK	Proteína serina quinasa dependiente de calcio/calmodulina
CaM	Calcio   calmodulina
CCR	Receptor de quimiocinas C-C
CXCL	Quimiocina motivo C-X-C
CXCR	Receptor de quimiocinas C-X-C
CD	Cúmulo de diferenciación
CM	Coctel de maduración
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CPA	Célula presentadora de antígeno
CR	Receptor de complemento
C-terminal	Carboxilo terminal
CY3	Cianina 3
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DC	Célula dendrítica
DCIR	Inmunorreceptor de DC
DHR	Región de Homología a Discs Large
Dlg1	Disc Large 1
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
EPB41	Proteína de membrana de eritrocitos banda 4.1
ESAT-6	Antígeno blanco de secreción temprana de 6 kDa
Fc	Fragmento cristalizante
G	Gravedades
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

GTP	Guanosín trifosfato
HKMtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra muerta por calor
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HRP	Peroxidasa de rábano
iDC	Célula dendrítica inmadura
IF	Inmunofluorescencia
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IRSp53	Proteína receptor de substrato de insulina de 53 kDa
JNK	Cinasas c-Jun N-terminal
kDa	KiloDalton
Kir	Canal de rectificación interna de potasio
L27	Dominio de homología con Lin 2, 7
LPS	Lipopolisacárido
MA	Macrófago
MAGUK	Guanilato cinasa asociada a la membrana
MALS1	Mammalian Lin Seven 1
mDC	Célula dendrítica madura
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
Mint 1	Proteína neuronal que interactúa con Munc18-1 1
MeOH	Metanol
MO	Monocito
MPP7	Proteína de andamio MAGUK P55 7
Munc 18-1	Mammalian uncoordinated-18-1
MyD88	Molécula de la respuesta primaria de diferenciación mieloide 88
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NEMO	Modulador esencial de NFκB
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NMDA	N-metil D-aspartato
NR2B	Receptor de NMDA subtipo 2B

NSC34	Línea celular híbrida de neuroblastoma y médula espinal de ratón
N-terminal	Amino terminal
nNOS	Óxido nítrico sintasa
NO	Óxido nítrico
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Disolución salina amortiguadora por fosfatos
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PDZ	PSD-95/Dlg/ZO-1
PDZbm	Motivo de unión a dominios PDZ
PGE2	Prostaglandina E2
PRRs	Receptores para el reconocimiento de patrones
PSA	Persulfato de amonio
PSD	Densidad postsináptica
PSD-95	Proteína de densidad postsináptica 95
RIPA	Ensayo de inmunoprecipitación
RPM	Revoluciones por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Suero fetal bovino
SH3	Dominio de homología con SRC 3
SDS	Sodio dodecilsulfato
TAP	Transportador asociado con la presentación de antígeno
TBS	Disolución salina tampona con Tris
TBS-T	Disolución salina tampona con Tris con Tween-20
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformador $\beta$
Th	Linfocitos T colaboradores
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
TLR	Receptor tipo Toll
T.A.	Temperatura ambiente
Veli1	Vertebrate Lin7
WB	Western Blot
ZO-1	Zonula occludens-1

## 2. Resumen

Las proteínas PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) tienen la función principal de andamiaje y formación de complejos multiproteicos, a partir de la cual se derivan otras funciones; como la transducción de señales, formación y mantenimiento de polaridad celular; estas proteínas han sido estudiadas ampliamente en células epiteliales y neuronas, sin embargo, poco se sabe de ellas y sus funciones en células de la respuesta inmunológica innata. De las células que conforman la respuesta inmunológica innata son parte las células dendríticas (DC), cuya principal función es el procesamiento y presentación de antígenos a células de la respuesta inmunológica adaptativa; y los macrófagos (MA), cuya principal función es la destrucción de patógenos y células apoptóticas. Recientemente en nuestro laboratorio se estudiaron 83 genes PDZ en DC y MA y se descubrió que 75 de éstos se expresan de manera basal en ambos tipos celulares. Al exponer estas células a estímulos proinflamatorios y de fagocitosis en un curso de tiempo se observaron cambios en la expresión del mRNA de múltiples genes PDZ, entre ellos el gen de Lin7A, el cual en DC tiende a aumentar y en MA disminuye significativamente. Estos resultados sugieren que Lin7A tiene alguna función importante en estos dos tipos de células, por lo que, a partir DC y MA diferenciados de monocitos obtenidos de paquetes de sangre de población humana abierta, se analizó la expresión basal de la proteína Lin7A en ambos tipos celulares, los cambios en la expresión ante estímulos proinflamatorios y de fagocitosis (*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra muerta por calor, que promueve principalmente fagocitosis por receptor de complemento 3 y *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra viva, que favorece la estimulación vía TLR 2, 4 y 9) en un curso de tiempo; así como la localización subcelular de Lin7A en DC y MA. Los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo mostraron que, con la mayoría de los estímulos, a excepción de las DC estimuladas con H37RA muerta por calor, hay una tendencia de aumento de la expresión de Lin7A tanto en DC como en MA, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Los resultados de IF mostraron que, en DC, Lin7A se expresa en vesículas citosólicas y cerca de la membrana plasmática, y con el estímulo de lipopolisacárido aumenta la intensidad de la señal y número de vesículas. En MA, Lin7A se expresa de manera basal en lo que parece ser la membrana citoplasmática y citoplasma, y su señal emitida aumenta con el estímulo en

cuatro individuos analizados mientras que en un sólo el estímulo provoca que Lin7A se pierda de la membrana plasmática y aumenta su expresión en el citosol mismo que regresa el estado basal. Estos resultados sugieren que Lin7A participa en las respuestas inmunes innatas inducidas por estímulos como lipopolisacárido, fagocitosis de H37Ra viva y muerta por calor y un coctel de citocinas proinflamatorias.

### 3. Introducción

#### 3.1 Células de la respuesta inmunológica innato

La respuesta inmunológica se puede dividir en 2 grandes ramas, la respuesta inmunológica innata y la adaptativa. La primera se compone principalmente por las barreras físicas y químicas, células fagocíticas, células dendríticas (DC) y proteínas en la sangre; es la primera línea de defensa contra patógenos (Abbas, 2015); las células de la respuesta inmune innata poseen en su superficie receptores para el reconocimiento de patrones (PRRs) como lo son receptores tipo Toll (TLR), receptores de manosa, receptores de DNA, entre otros; los cuales reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) los cuales son esenciales para la supervivencia del patógeno y usualmente tienen características moleculares que los hacen diferenciables de las células del hospedero, algunos ejemplos de PAMPs son el lipopolisacárido (LPS), lipoarabinomanano, flagelina, entre otros. Al darse este reconocimiento se desencadena una respuesta inmune la cual, dependiendo del PRR que haya sido estimulado puede ser de fagocitosis o seguir una vía de señalización culminando en la liberación de citocinas proinflamatorias (Alberts, 2002; Ito, 2013; Li, 2021). Por su parte, el sistema inmunológico adaptativo está constituido por los linfocitos y sus productos de secreción, principalmente los anticuerpos y a diferencia de la inmunidad innata, tiene la capacidad de especificidad por antígenos y de memoria (Dettmer, 2021; Mellman, 2013).

De la respuesta inmunológica innata, las DC y macrófagos (MA) son parte de las células que la conforman, ambos tipos celulares provienen de la línea mielocítica de médula ósea, salen a sangre periférica como monocitos e infiltran en los tejidos donde se terminan de diferenciar. Estas células tienen como funciones principales reconocer a los patógenos, fagocitarlos, destruirlos y presentar antígenos a células del sistema inmunitario adaptativo; así como atraer otras células hacia los focos de infección. Además, son capaces de producir citocinas con múltiples funciones tanto en la respuesta inmunológica innata, adaptativa y en la reparación tisular (Abbas, 2015; Ross, 2021; Weisheit, 2015).

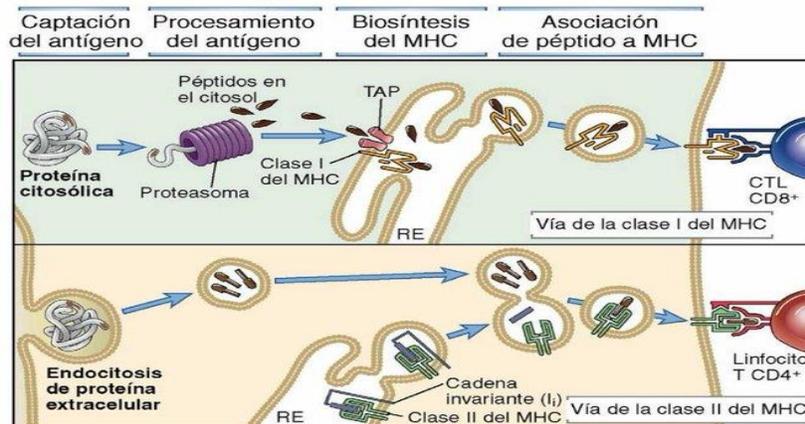
### 3.1.1 Células dendríticas (DC)

Las DC son células del sistema inmunológico innato que enlazan la inmunidad innata con la adaptativa ya que su principal función es la captación, procesamiento y presentación de antígenos a células T y tienen la capacidad única de estimular linfocitos T vírgenes, siendo las células presentadoras de antígeno (CPA) más eficaces. Tienen una amplia distribución por todos los tejidos linfáticos, los epitelios de las mucosas y el parénquima de los órganos. Poseen largas prolongaciones en sus membranas y tienen la capacidad de fagocitar, derivan de precursores de la médula ósea de la estirpe de fagocitos mononucleares y en humanos se conocen múltiples subpoblaciones: DC plasmacitoides, DC clásicas, DC derivadas de monocitos y células de Langerhans. Expresan receptores para el reconocimiento de patrones (PRR), responden a los patógenos secretando citocinas y tienen una función primordial en la presentación de antígenos a los linfocitos T y B y mediar su polarización a células efectoras (Abbas, 2015; Balan, 2019; Chow, 2011; Martin, 2019; Mellman, 2013; Satpathy, 2012; Weisheit, 2015).

Las DC que se encuentran en los tejidos se mantienen en un estado de inmadurez, cuando captan antígenos de algún patógeno, maduran y migración hacia los ganglios linfáticos regionales. Estas células pueden capturar antígenos mediante varios mecanismos, como lo son fagocitosis, macropinocitosis, endocitosis mediante la interacción con múltiples receptores, siendo los más relevantes la familia de lectinas tipo C, como CD205 y el inmunorreceptor de DC (DCIR); el receptor de manosa de macrófagos; receptores del fragmento cristalizante (Fc) y TLRs (Bio-technique, 2002; Savina, 2007; Shrimpton, 2009).

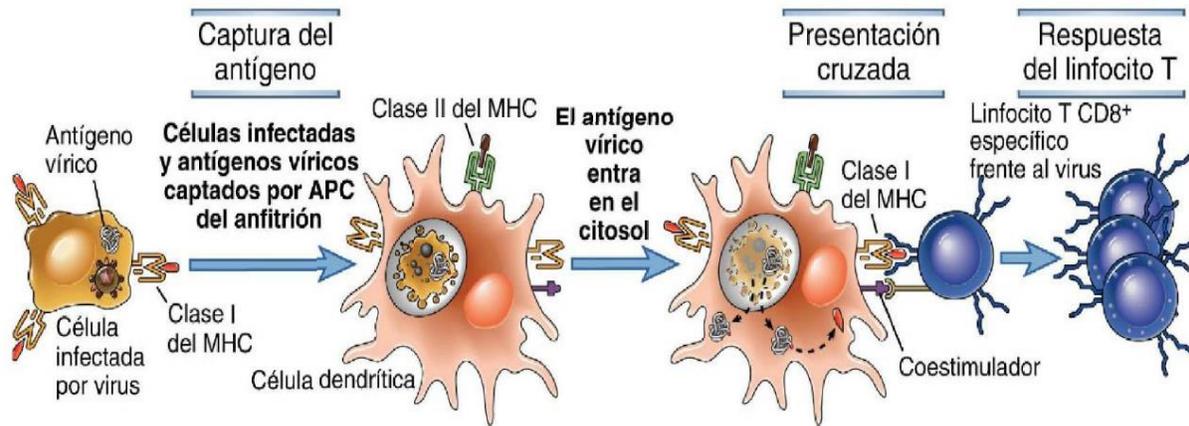
Una vez que captan el antígeno, lo procesan para poder presentarlo en su complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Existen 2 vías para obtener antígenos y presentarlos en los MHC (Figura 1); la primera es la vía endocítica en la cual, una serie de proteasas endosomales, conocidas como catepsinas, degradan a las proteínas endocitadas dentro de los mismos endosomas; los péptidos resultantes se pueden cargar en el MHC-II y se presentan en la membrana plasmática para que sean reconocidos por linfocitos T CD4<sup>+</sup>. La otra vía utilizada es la ruta citosólica en la cual el proteasoma, un complejo multimérico que se encuentra en el citoplasma, produce péptidos de proteínas

endógenas, los cuales son trasladados por la proteína TAP al retículo endoplásmico, donde se unen a las moléculas de MHC-I, las cuales siguen un proceso de excreción a través del aparato de Golgi hasta llegar a la membrana plasmática para ser presentados e inspeccionados por linfocitos T DC8<sup>+</sup> (Wilson, 2005).



**Figura 1: Vías citosólica y endocítica para el procesamiento y presentación de antígenos.** En la vía citosólica, proteínas endógenas son degradadas por el proteasoma, los péptidos resultantes se internalizan al retículo endoplásmico por TAP, se cargan al MHC-I y se exportan a la membrana por el aparato de Golgi. En la vía endocítica, antígenos endocitados son degradados en un endosoma al cual se une una vesícula que tiene al MCH-II, se ancla el péptido externo al MCH-II y se exporta a la membrana citoplásmica (Tomado de Abbas, 2015)

Las DC tienen una tercera forma de presentación, conocida como presentación cruzada, en la cual un antígeno endocitado se puede presentar en moléculas de MHC-I para ser reconocido por linfocitos T DC8<sup>+</sup>. Se conocen 2 vías principales para la presentación cruzada, la primera es la vía vacuolar, la cual es independiente de TAP, no requiere del proteasoma pero es sensible a inhibidores de la proteólisis lisosomal, lo cual sugiere que el procesamiento del antígeno y su unión a la molécula de MHC-I ocurren en compartimientos endocíticos. La segunda es la vía citosólica (Figura 2), la cual es dependiente del proteasoma y propone que las proteínas endocitadas entran al citosol donde son degradadas por la proteasoma; los péptidos obtenidos se pueden cargar en el MHC-I, sin embargo, aún no está claro si este último proceso se lleva a cabo en el retículo endoplásmico o en endosomas (Joffre, 2012).



**Figura 2: Presentación cruzada por vía citosólica en DC.** El antígeno es endocitado por la DC y pasa al citosol donde es degradado para ser cargado en moléculas del MHC-I (Tomada de Abbas, 2015).

De igual manera, al procesar el antígeno, las DC comienzan su proceso de maduración (Savina, 2007), en el cual las células sufren cambios morfológicos y fenotípicos. Las células dendríticas inmaduras (iDC) tienen una forma más redonda, mientras que a comparación, las células dendríticas maduras (mDC) tienen un mayor número de pseudópodos y una apariencia más rugosa a comparación de las iDC y; a nivel fenotípico, las iDC expresan muy pocas moléculas de coestimulación y secretan bajos niveles de citocinas, sin embargo, al madurar las mDC aumentan sus niveles de expresión de MHC-II, favoreciendo su capacidad de presentación de antígenos a células T CD4<sup>+</sup> (Min, 2019), HLA I y II, moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y CD83 y moléculas quimioatrayentes de células Th1 como CXCL9, CXCL10, CXCL11 y CCL5 (Jin, 2010). Además de ello, las mDC presentan una disminución en la expresión de algunos receptores como CCR1, CCR5, CCR6, CXCR1, DCIR, el receptor de manosa de macrófagos, los receptores para las Fcγ y Fcε (Bio-technique, 2002), reafirmando el papel de estos receptores en la captación de antígenos, pues al madurar las DC pasan a tener una función más especializada hacia la presentación de antígenos y estos receptores que eran destinados al reconocimiento de PAMPs la mDC ya no los necesita y, por ende, disminuye la expresión de los mismos..

Las mDC también aumentan la expresión de CXCR4 y CCR7, este último es un receptor de CCL19 y CCL21 (Bio-technique, 2002), quimiocinas producidas en las zonas T de los

ganglios linfáticos lo cual, aunado a que las mDC pierden su adherencia a los tejidos, reorganizan su citoesqueleto y aumentan su movilidad (Patente, 2019), esto les permite que puedan migrar a los ganglios linfáticos en donde presentan los antígenos a los linfocitos T y, gracias a que ya tuvieron este proceso de maduración en el que expresan una mayor cantidad de moléculas de coestimulación, se puede llevar a cabo una exitosa sinapsis inmunológica.

Además, estudios anteriores de nuestro grupo de trabajo descubrieron que en DC, las proteínas PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1), proteínas con funciones de andamiaje y formación de complejos multiprotéicos, Scrib y Dlg1 son fundamentales para la correcta presentación de antígenos a Linfocitos T, pues se encontró que al silenciar la traducción de Scrib no incrementaba la expresión de CD86 y se veía disminuida la producción de la interleucina (IL)-12 al madurar la DC; por su parte al silenciar la traducción de Dlg1 no aumenta la expresión de CD83 y la producción de IL-6 e IL-12 se ve disminuida al madurar la DC. Esto deriva en una deficiente formación de la sinapsis inmunológica y una incorrecta coestimulación tras enfrentar a las mDC silenciadas de Scrib y Dlg cargadas con antígeno a linfocitos T, lo cual se vio como una disminución en la producción del interferón (IFN)- $\gamma$  por parte de los linfocitos T (Barreda, 2020). Dados estos hallazgos, cabe la posibilidad de que haya más proteínas PDZ involucradas en alguna función de las DC, ya que los procesos para identificar, procesar y presentar antígenos implican interacciones entre múltiples proteínas en las cuales podrían encontrarse más proteínas PDZ.

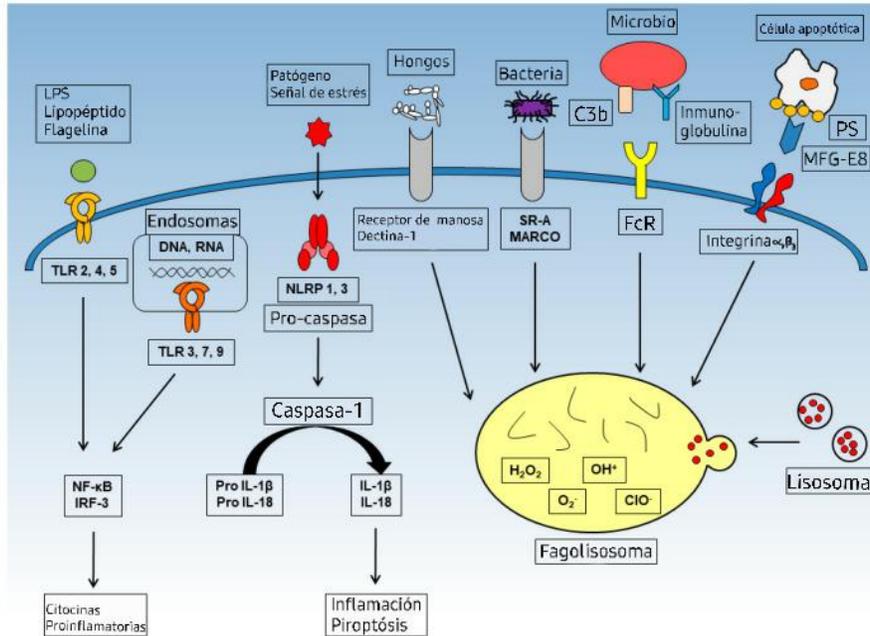
### **3.1.2 Macrófagos (MA)**

Los macrófagos provienen de la línea mielocítica, estas se originan en la médula ósea, al salir a sangre periférica se llama monocito y migran a los tejidos donde pueden completar su diferenciación a una gran variedad de macrófagos residentes de tejido, los cuales son capaces de adoptar diversas formas tras ser estimulados. Dependiendo del tejido en el que se encuentren, reciben nombres específicos, por ejemplo, en el sistema nervioso central se les conoce como microglía, en el hígado células de Kupffer y en los pulmones se les llama macrófagos alveolares (Abbas, 2015; Gordon, 2005; Ross, 2021).

Los MA en su membrana poseen diversos PRRs (Figura 3) para reconocer patógenos y células apoptóticas. Entre los más importantes se encuentran los TLRs, receptores de manosa, receptores carroñeros y receptores de opsoninas como lo son los receptores de Fc y receptores de complemento, entre otros (Fu, 2021; Schlesinger, 1996; Taylor, 2005) y posteriormente y llevar a cabo su principal función la cual es fagocitar y degradar a estos patógenos y fragmentos celulares. Para poder fagocitar, se necesita de la polimerización de actina, en MA se ha visto que se necesita de la Dinamina, una GTPasa atípica, para regular esta polimerización de actina, incluso si las partículas fagocitadas entran por distintos receptores (Farkas, 2019; Weisheit, 2015).

Después de haber sido fagocitado, el patógeno o célula apoptótica es degradado mediante diversos procesos los cuales generan un estrés oxidativo a través de especies reactivas de oxígeno con el fin de destruir al patógeno o célula apoptótica fagocitados. La NADPH-oxidasa produce anión superóxido al transferirle un electrón del NADPH a una molécula de oxígeno, el anión superóxido puede ser convertido en peróxido de hidrógeno por la superóxido dismutasa (Canton, 2021). De manera concomitante la mieloperoxidasa genera más estrés oxidativo produciendo ácido hipocloroso en presencia de cloruro y peróxido de hidrógeno (Shaeib, 2016). De igual manera, una serie hidrolasas y lisosomas se fusionan con el fagosoma y la bomba de protón ATPasa baja el pH del fagolisosoma permitiendo que las proteasas e hidrolasas lleven a cabo su función para destruir al patógeno o célula apoptótica (Hirayama, 2017; Maxson, 2014).

Los MA tienen como su función principal la fagocitosis y destrucción de patógenos y células apoptóticas, sin embargo, también tienen función de CPA, pero no tan especializada como las DC. Los péptidos derivados de la destrucción de los patógenos pueden ser presentados en su MHC-II y activar linfocitos T CD4<sup>+</sup> en los tejidos, incluso tienen la capacidad de efectuar presentación cruzada; aunque no está tan bien comprendida como en DC. Se cree que también tiene un papel en la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> naive y de memoria (Muntjewerff, 2020).



**Figura 3: Mecanismos de inflamación y de fagocitosis de los MA.** Se muestran los distintos PRRs que poseen los MA, sus ligandos y la vía que estos antígenos van a seguir una vez dentro del MA. (Modificado de Hirayama, 2017)

Una vez que el macrófago es activado, puede seguir varios fenotipos posibles, los dos más comunes son: M1, los cuales se polarizan mediante citocinas Th1 como GM-CSF, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  y LPS, estos expresan citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-12. El otro fenotipo son los M2, se polarizan con citocinas Th2 como IL-4 e IL-13 y expresan citocinas antiinflamatorias como IL-10 y factor de crecimiento transformador-beta (TGF- $\beta$ ) (Ross, 2021; Yao, 2019; Zhang, 2021).

Además, se sabe que la proteína PDZ Scrib se necesita para que el macrófago lleve a cabo el estallido respiratorio en el fagosoma, pues esta proteína es reclutada a los fagosomas y se ha reportado que es necesaria para la destrucción de *Staphylococcus aureus*, ya que se une con su dominio PDZ 4 al C-terminal de la subunidad p22phox de la NADPH oxidasa (Zheng, 2016). De igual manera, recientemente se descubrió que la proteína PDZK1 promueve la protección dependiente de HDL contra la necroptosis en MA (Sakarya, 2021). Con estos antecedentes, es posible que se encuentren más proteínas PDZ involucradas en alguna función de los MA, ya que todas las vías de

señalización y procesos de fagocitosis implican reacciones e interacciones multiprotéicas muy complejas en las cuales se podrían ver involucradas más proteínas PDZ.

### **3.2 Proteínas PDZ**

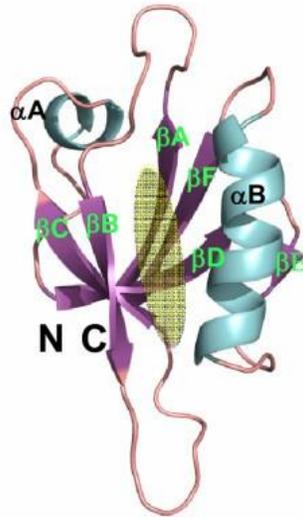
Los dominios PDZ se descubrieron con base en las repeticiones de secuencia en las proteínas Postsynaptic Density 95 [PSD95], Discs Large [Dlg] y Zonula Occludens [ZO-1], que contenían estos dominios. En un principio se llamaron Dominios GLGF (Gly-Leu-Gly-Phe), por el motivo que se repite en el N-terminal de su secuencia, o dominios DHR (Región de Homología a Discs Large, por sus siglas en inglés). Después se adoptó el acrónimo PDZ, que proviene de las letras iniciales de las 3 primeras proteínas en las que fueron descubiertos estos dominios: PSD95, Dlg y ZO-1 (Nourry, 2003). Las proteínas que tienen dominios PDZ, se les conoce como proteínas PDZ.

Las proteínas PDZ se pueden clasificar en 3 familias de acuerdo con los dominios que poseen. La primera son aquellas proteínas que sólo tienen uno o múltiples dominios PDZ, suelen organizarse en tandem. La segunda es la súperfamilia de las MAGUK, estas contienen un dominio SH3, un dominio guanilato cinasa y dominios PDZ. La tercera familia es aquella que además de su dominio PDZ tienen otros dominios de interacción, como lo son L27 (Hung, 2002; López, 2015; Yutaka, 1998;)

Los dominios PDZ se encuentran distribuidos en un gran número de organismos eucariotas (Sheng, 2001; Manjunath, 2017) y generalmente se unen a una secuencia específica de cuatro residuos de aminoácido en la sección C-terminal de otra proteína, a la cual se le conoce como motivo de unión a dominios PDZ (PDZbm) (Barreda, 2018); sin embargo, los dominios PDZ también son capaces de formar dímeros entre ellos e incluso interactuar con lípidos como el fosfatidilinositol (Fanning, 1999; Gallardo, 2010). En estos PDZbm, el residuo de aminoácido (aa) que se encuentra en el extremo Carboxilo, se le denomina como 0, y hacia el extremo amino se numeran los siguientes residuos de aa como -1, -2, -3 y así subsecuentemente. La función principal de las proteínas PDZ es la formación de complejos multiproteicos, fungiendo como andamios entre otras proteínas a partir de la cual se derivan sus demás funciones como la polaridad celular, transporte vesicular, entre otras (Giallourakis, 2006).

### 3.2.1 Estructura

Los dominios PDZ (Figura 4) suelen tener entre 80 a 100 aa y tienen una estructura muy conservada, se componen de 6 láminas  $\beta$  ( $\beta A$  - $\beta F$ ), una  $\alpha$  hélice corta ( $\alpha A$ ) y una  $\alpha$  hélice larga ( $\alpha B$ ). Los extremos amino y carboxilo terminal del dominio PDZ se encuentran cerca uno del otro, formando el sitio de unión a PDZbm entre  $\alpha B$  y  $\beta B$  (Katja, 2012; Lee, 2010).



**Figura 4: Estructura del dominio PDZ de Dvl-1.** La estructura de un dominio PDZ consiste en 6 láminas  $\beta$ , una  $\alpha$  hélice corta y una  $\alpha$  hélice larga. Entre la lámina  $\beta 2$  y la  $\alpha$  hélice larga se forma una cavidad hidrofóbica, que es el sitio de unión a PDZbm (amarillo) (Tomado de Lee, 2010).

De acuerdo con el tipo de PDZbm al que se unen, se pueden clasificar en 3 tipos, como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1: Tipos de PDZbm.** Donde X es un residuo de aa cualquiera y  $\Phi$  es un residuo de aa hidrofóbico.

Tipo PDZbm	Residuos de aa
Tipo 1	-X-S/T-X- $\Phi$
Tipo 2	-X- $\Phi$ -X- $\Phi$
Tipo 3	-X-D/E-X- $\Phi$

Los dominios PDZ cambian la composición del sitio de unión a PDZbm, acorde al tipo de PDZbm al que se unen: los dominios PDZ que unen PDZbm clase I contienen una histidina conservada que interactúa con el grupo hidroxilo de la serina o treonina en la posición -2 del PDZbm; mientras que los dominios PDZ que se unen a PDZbm de clase II contienen residuos de aa hidrofóbicos en la zona terminal de la lámina  $\beta 2$  que interactúan con el residuo de aa hidrofóbico en la posición -2 del PDZbm (Gutiérrez, 2021; Romero, 2011).

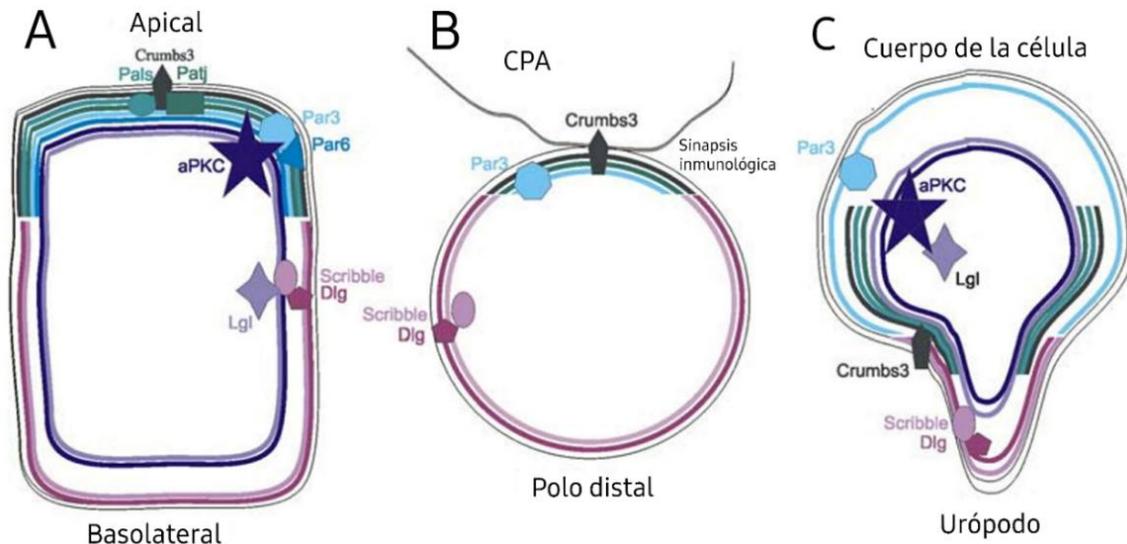
### **3.2.2 Función**

En los seres humanos, las proteínas PDZ se han estudiado mayormente en neuronas y células epiteliales, donde se sabe que su función primordial es el ensamblaje de complejos multiprotéicos, a partir de la cual se derivan otras funciones como lo son la formación y mantenimiento de la polaridad celular, señalización y transporte de proteínas (Barreda, 2018).

En neuronas, en las sinápsis y uniones neuromusculares existe una estructura llamada densidad postsináptica (PSD) la cual es importante para emitir respuestas a señales entrantes. En esta estructura se han encontrado proteínas PDZ con varios dominios PDZ con la función de andamiaje para ensamblarla y mantenerla. Por ejemplo, PSD95 posee 3 dominios PDZ, puede unirse a la subunidad NR2B del receptor de N-metil D-aspartato (NMDA) con sus dominios PDZ 1 y 2 y con su dominio PDZ 2 unirse a la óxido nítrico sintasa (nNOS). Esta localización de nNOS al receptor de NMDA se cree que permite la síntesis eficiente de óxido nítrico (NO) en respuesta a la entrada de  $Ca^{2+}$  por la apertura del canal de NMDA. Se cree que estas interacciones entre dominios PDZ y sus ligandos son heterogéneas y redundantes, ya que al eliminar algunas proteínas PDZ de la sinapsis no se pierde totalmente la función de esta, sólo hay una disminución en la eficiencia del complejo receptor sináptico (Baruch, 2001; Craven, 1998).

También se ha estudiado su papel en células del sistema inmunológico adaptativo, donde se sabe que algunas proteínas PDZ, como Crumbs3, Scribble y Dlg son fundamentales

para la formación de la sinapsis inmunológica y Scribble y Dlg son necesarios para la formación de urupodos en linfocitos T (Figura 5) (Ludford, 2005).

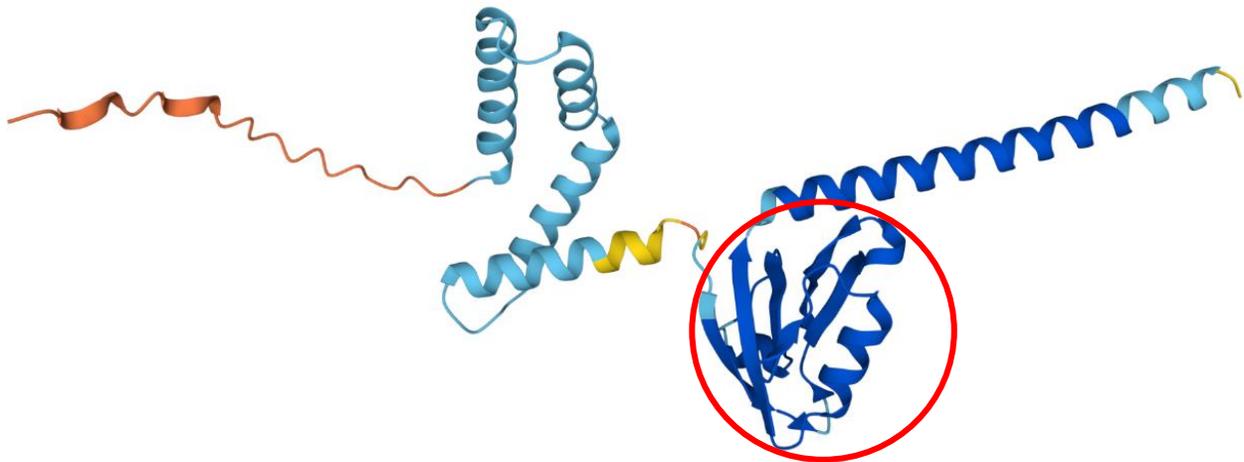


**Figura 5: Regulación de algunas proteínas PDZ en linfocitos T durante distintos estadios.** (A) Representación de la polaridad de las proteínas PDZ en una célula epitelial. (B) Un linfocito T presentando antígeno en un estado tardío, se observa que Crumbs3 y Par3 son reclutadas a la sinapsis inmunológica, mientras que Scribble y Dlg se mantienen en el polo distal. (C) Un linfocito T con un urópodo, se observa que Dlg y Scribble son reclutadas a la zona del urópodo, Crumbs3 se mantiene en una zona media y Par3 se encuentra en el cuerpo de la célula (Modificado de Ludford, 2005).

Sin embargo, poco se sabe sobre estas proteínas en las células de la respuesta inmune innata como lo son, entre otras, las DC y MA y las funciones que puedan tener en estas células. En nuestro laboratorio es de interés estudiar el papel de las proteínas PDZ en estos dos tipos celulares, ya que se sabe que en células epiteliales y neuronas tienen funciones de formación y mantenimiento de polaridad celular y tráfico vesicular (Baruch, 2001), por lo que en estas CPA es posible que tengan alguna función en la formación de alguna polaridad transitoria, vía de señalización por PRRs o en el tráfico de diversas vesículas como vesículas de exocitosis o fagosomas. Además, recientemente se descubrió que el mRNA de 75 genes PDZ se expresan de manera basal tanto en DC y MA, entre ellos el de Lin7A (Rosas, 2022), por lo que es posible que la proteína tenga funciones importantes en estas CPA.

### 3.3 Lin7A

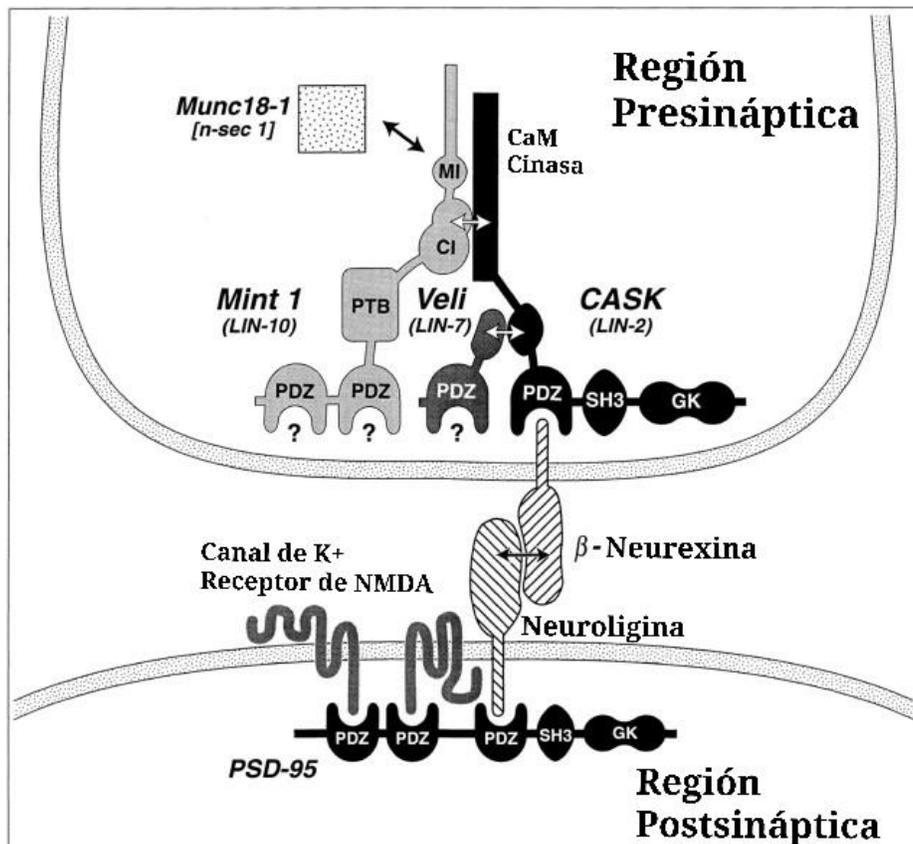
Lin7A, también conocida como Mammalian Lin Seven 1 (MALS1) o Vertebrate Lin7 (Veli1), es una proteína PDZ de 26 kDa con 233 residuos de aa que posee un dominio L27 en sus residuos de aa 25-80 y un único dominio PDZ en sus residuos de aa 108-190; que se une a PDZbm tipo I. Lin7A juega un rol en establecer y mantener la distribución asimétrica de canales y receptores en la membrana plasmática de células polarizadas formando complejos multiproteicos asociados a la membrana que regulan la entrega y reciclaje de proteínas. (Dmitri, 2004; Uniprot, 2022). La estructura tridimensional de Lin7A se muestra en la Figura 6.



**Figura 6: Estructura tridimensional de Lin7A.** En rojo se resalta su dominio PDZ (Tomado de Uniprot, 2022).

Lin7 fue descubierta originalmente en *Caenorhabditis elegans* junto con otras dos proteínas PDZ, Lin2 y Lin10. Estas tres proteínas forman un complejo que coordina la expresión de Let-23 a la membrana basolateral de las células progenitoras de vulva; alguna mutación en cualquiera de estas proteínas causa que Let-23 se localice de manera aberrante a la membrana apical, lo cual interrumpe el desarrollo de las células (Shelly, 2003). En mamíferos, los ortólogos de estas proteínas PDZ son: Lin7=Lin7; Lin2=CASK y Lin10=Mint 1. En mamíferos existen tres isoformas de Lin7: Lin7A/B/C (Olsen, 2004), cada una con su propio gen.

En seres humanos, en las neuronas, Lin7A forma un complejo tripartito que se une con CASK a través de su dominio L27 y CASK, a su vez, se une a Mint 1 vía su dominio CaM (Figura 7); Mint 1 es capaz de unirse también a Munc18-1, una proteína de tráfico vesicular permitiéndole a este complejo tener la capacidad de tráfico membranar (Figura 7). Lin7A también es capaz de interactuar mediante su dominio PDZ, con receptores tirosin cinasa, canales de K<sup>+</sup> como Kir 2.2 y Kir 2.3, receptores de NMDA y otros componentes anclándolos a la membrana plasmática, así dándole al complejo tripartito funciones de transducción de señales (Dmitri, 2004; Lozovatsky, 2009; Stefan, 1998). Este complejo multiproteico es muy parecido en estructura y función al que originalmente se descubrió en *C. elegans* con Lin7, Lin2 y Lin10; el que la función de estas proteínas esté tan conservada entre especies, resalta su importancia.



**Figura 7: Modelo del complejo formado por Lin7A, CASK y Mint 1 en la zona presináptica.** CASK se une a Mint 1 vía su dominio CaM y se une a Lin7A a través de su dominio L27, dejando libre el dominio PDZ de Lin7A para poder unirse a otras proteínas y así poder anclarlas a la membrana presináptica (Modificado de Stefan, 1998).

Lin7A también se expresa en la región postsináptica, asociada a la proteína PSD-95 y, vía su dominio PDZ, a receptores de glutamato tipo NMDA, teniendo así Lin7A una función en la regulación en el reclutamiento de receptores de neurotransmisores a la región postsináptica (Jo, 1999).

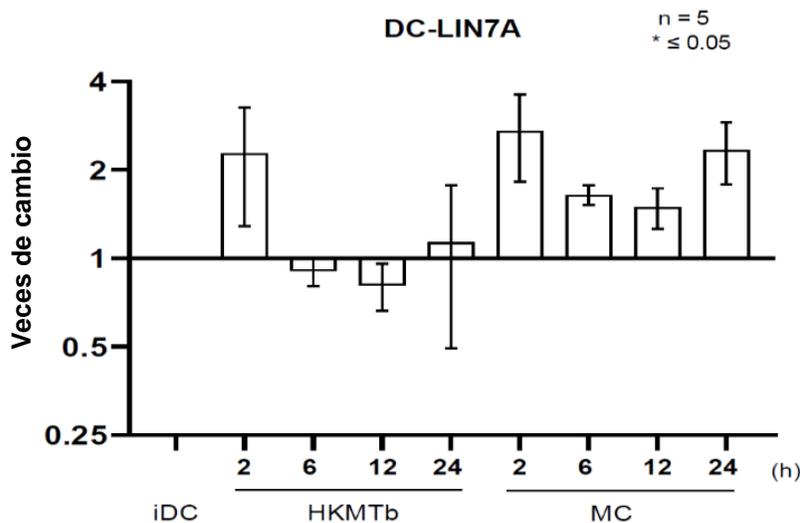
De igual manera, en neuronas Lin7A se puede unir mediante su dominio PDZ al PDZbm de la proteína receptor de substrato de insulina de 53 kDa (IRSP53), para promover la formación de neuritas y filopodios mediante la regulación de la polimerización de filamentos de actina (Crespi, 2012); también se sabe que este mismo complejo proteico entre Lin7A e IRSP53 se requiere para regular la morfología mitocondrial (Ferrari, 2016).

In vitro se ha descubierto que Lin7A también puede formar un complejo tripartito con MPP7 yDlg1. MPP7 se une mediante su dominio L27 C-terminal con el dominio L27 de Lin7A y este dímero se une a DLG1 usando el dominio L27 N-terminal de MPP7. Este complejo se localiza en las uniones adherentes de células epiteliales (Bohl, 2007). En esta configuración, el dominio PDZ de Lin7A también queda libre, lo cual abre la posibilidad de que sea capaz de anclar otras proteínas, como el canal de K<sup>+</sup>, Kir 2.3 (Dmitri, 2004) a estas uniones adherentes en células epiteliales.

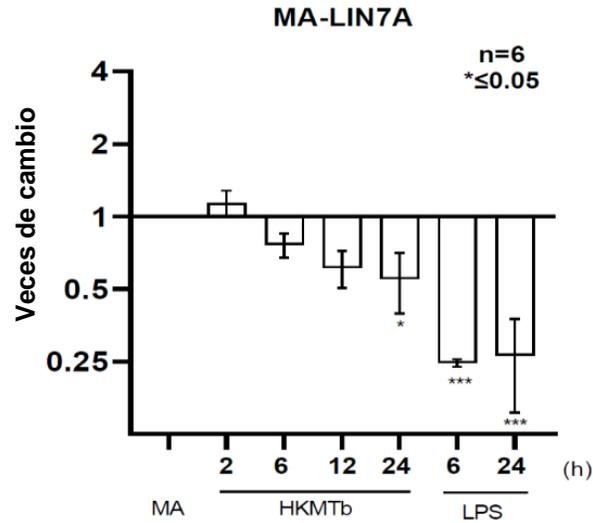
En ratones esta proteína PDZ es necesaria para el desarrollo del cerebro y su inhibición en embriones de retarda la migración de las neuronas de la placa cortical (precursora de la corteza cerebral) y el crecimiento de los axones hacia el hemisferio cerebral contralateral tras salir del cuerpo calloso. Dados estos hallazgos, se ha sugerido que Lin7A es la proteína responsable de causar el fenotipo del síndrome de delección 12q21 (Matsumoto, 2014), el cual provoca deficiencia mental, falta de cabello, frente pronunciada, rostro triangular, orejas posicionadas debajo de lo normal, entre otros síntomas (Di Nora, 2022).

En nuestro laboratorio se ha descubierto que el mRNA del gen que codifica a Lin7A, se expresa tanto en DC como en MA. Además, al estimular a las DC con la cepa de laboratorio *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra muerta por calor (HKMtb), y con un coctel de maduración (CM) (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , y prostaglandina E2 (PGE2)) en un curso de tiempo, se observó una tendencia al aumento de la expresión del mRNA (Figura 8) y una disminución significativa al estimular MA con HKMtb y LPS (Figura 9) (Rosas, 2022).

También se sabe que al polarizar MA a un fenotipo M2 con IL-10, la expresión del RNA de Lin7A también disminuye de manera estadísticamente significativa (Lurier, 2017); lo cual nos llevó a pensar que Lin7A puede ser relevante en diversas funciones de las DC y MA, pues las funciones de Lin7A como lo son tráfico vesicular, transducción de señales y la formación de una polaridad celular en la región pre y postsináptica ya caracterizadas en neuronas o la polaridad celular localizada hacia la membrana basolateral en células epiteliales (Olsen, 2004), podrían también intervenir en las funciones de estas CPA como lo son las vías de señalización por PRRs, formación de prolongación de la membrana plasmática, fagocitosis, formación de polaridades transitorias, entre otras. Por lo que se quiere saber si también existen cambios en la expresión de Lin7A a nivel de proteína, así como en su localización subcelular en DC y MA en estado basal y después del tratamiento con diferentes estímulos para determinar si Lin7A podría estar participando en alguna función de estas CPA.



**Figura 8: Cambios de expresión del mRNA de Lin7A en DC estimuladas con H37Ra muerta por calor y coctel de maduración en un curso de tiempo.** Se realizó un análisis de varianza de una vía para determinar si había diferencia estadísticamente significativa con el 95% de confianza. No se observa diferencia estadísticamente significativa a ningún tiempo con ninguno de los 2 estímulos (Tomado de Rosas, 2022).



**Figura 9. Cambios de expresión del mRNA de Lin7A en MA estimulados con H37Ra muerta por calor y LPS en un curso de tiempo.** Se realizó un análisis de varianza de una vía para determinar si había diferencia estadísticamente significativa con el 95% de confianza. Se observa diferencia estadísticamente significativa en el estímulo con H37Ra muerta por calor a las 24 horas y con LPS a las 6 y 24 horas (Tomado de Rosas, 2022).

#### **4. Justificación**

En nuestro laboratorio recientemente se descubrió que el mRNA del gen que codifica a Lin7A, se expresa en células dendríticas y macrófagos. Además, al exponer a un estímulo proinflamatorio y de fagocitosis en un curso de tiempo se observó una tendencia de aumento en la expresión del mRNA en células dendríticas y una disminución significativa en macrófagos. Tomando en cuenta las funciones de la proteína Lin7A de tráfico vesicular, transducción de señales y de polarización celular en neuronas y células epiteliales, el presente trabajo se enfocará en el estudio de los cambios en la expresión y la localización subcelular de la proteína PDZ Lin7A en células dendríticas y macrófagos ante distintos estímulos PRR dependientes para comprender qué funciones está desempeñando Lin7A en estas células de la respuesta inmune innata.

## **5. Hipótesis**

Los niveles de expresión a nivel de mRNA Lin7A tiende a aumentar en células dendríticas y disminuye en macrófagos al recibir distintos estímulos proinflamatorios y de fagocitosis en un curso de tiempo, asimismo, dadas las funciones de la proteína Lin7A de tráfico vesicular, transducción de señales y su localización polarizada hacia las regiones pre y postsinápticas en neuronas y membrana basolateral en células epiteliales, es probable que tenga funciones similares en CPA y por lo tanto también haya cambios en la expresión y localización subcelular de la proteína con los estímulos aplicados en células dendríticas y macrófagos en un curso de tiempo.

## **6. Objetivos**

### **6.1 Objetivo General**

Analizar los cambios en la expresión y localización subcelular de Lin7A en células dendríticas y macrófagos.

### **6.2 Objetivos particulares**

Analizar los cambios en la expresión de Lin7A en células dendríticas y macrófagos en la respuesta ante diferentes estímulos proinflamatorios y de fagocitosis.

Analizar los cambios en la localización subcelular de Lin7A en células dendríticas y macrófagos en la respuesta ante diferentes estímulos proinflamatorios y de fagocitosis.

## **7. Metodología**

### **7.1 Obtención de DC y MA por diferenciación de monocitos humanos**

#### **7.1.1 Obtención de Monocitos CD14+ a partir de paquetes leucocitarios**

Se utilizaron 16 paquetes leucocitarios de donadores adultos entre 18 y 65 años, con peso mayor a 50 kg, sanos, que acudieron al banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Ciudad de México, tras la aprobación por el Comité de Ética y de Prevención de conflictos de interés en el INER (IRB# B16-20 aprobado en 2020). El presente estudio se realizó de acuerdo con los principios de la declaración de Helsinki. No se requirió el consentimiento informado por escrito de acuerdo con la legislación nacional y los requisitos institucionales.

La sangre se diluyó 1:3 con PBS 1X (Anexo I). En tubos de 50mL (Uniparts, China, REF 32104F) con 15 mL de Ficoll (ProteoGenix, Francia, REF 1114545) se colocan 30 mL de la dilución de sangre evitando romper el gradiente de densidad y se centrifugó (Eppendorf, Alemania, REF 5810R) a 800 G, 20°C durante 25 minutos, aceleración 1 y desaceleración 1.

Se recuperaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) por aspiración con una pipeta de transferencia (Sarstedt, Alemania, REF 86.1171) y se transfirieron a otro tubo de 50 mL, se llevó a un volumen de 50 mL con PBS 1X y se centrifugó a 1600 rpm, 20°C, 10 minutos, aceleración 9 y desaceleración 9.

Se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 5 mL de disolución de lisis de eritrocitos (Anexo I); se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Se ajustó el volumen a 50 mL con PBS 1X y se centrifugó a 800 rpm, 20°C durante 15 minutos.

Se retiró el sobrenadante con pipeta serológica (Sarstedt, Alemania, REF 86.1685.001) y se resuspendió el botón celular en PBS 1X; se hizo una dilución 1:10 con 10 µL de la suspensión celular y 90 mL de azul de tripano (Sigma Aldrich, Alemania, REF 23850)

0.04% y se colocaron 10  $\mu\text{L}$  en una cámara Neubauer (ISOLAB, Alemania, REF 075.03.001) para contar los PBMC.

Por cada  $500 \times 10^6$  PBMC, en 900  $\mu\text{L}$  de disolución de Miltenyi (Anexo I) se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de perlas magnéticas  $\alpha\text{-CD14}^+$  (Miltenyi Biotech, Alemania, REF 130-050-201) en un tubo de microcentrífuga (Sarstedt, Alemania, REF 72.692.005); se añadió la disolución anterior a la suspensión celular y se incubó en hielo 15 minutos agitando cada 5 minutos.

Posteriormente se añadieron 10 mL de disolución de Miltenyi y se centrifugó a 300 G,  $4^\circ\text{C}$  durante 10 minutos y se decantó completamente el sobrenadante. Se resuspendió el botón celular en 1 mL de disolución de Miltenyi, se hizo pasar por una columna LS (Miltenyi Biotech, Alemania, REF 130-042-401) fijada en un magneto y previamente equilibrada con 3 mL disolución de Miltenyi. Se lavó la columna 3 veces con 3 mL de disolución de Miltenyi. Cuando terminó de eluir se quitó la columna del magneto, se colocó en un tubo de 15 mL (Sarstedt, Alemania, REF 62.554.502), se añadieron 5 mL de disolución de Miltenyi y se presionó con un émbolo para recuperar los monocitos (MO) (células  $\text{CD14}^+$ ) en el tubo. Se añadieron 10 mL de disolución de Miltenyi y se centrifugó a 1600 rpm,  $4^\circ\text{C}$  durante 10 minutos.

Se resuspendió el botón celular en RPMI completo (Anexo I) y se hizo una dilución 1:10 con azul de tripano 0.04% para contar los monocitos en una cámara Neubauer. Se ajustó la suspensión celular con medio RPMI completo a  $18.945 \times 10^6$  MO para diferenciar a MA para WB,  $1.5 \times 10^6$  MO para diferenciar a MA para IF y  $60 \times 10^6$  MO para diferenciar a DC.

### **7.1.2 Diferenciación a DC**

De la suspensión de MO se tomaron  $60 \times 10^6$  MO, se transfirieron a dos tubos de 50 mL, se ajustó el volumen a 54 ml en total, se añadieron IL-4 (25 ng/mL) (Tonbo biosciences, EE. UU., REF 21-8044-U020) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (53 ng/mL) (Tonbo biosciences, EE. UU., REF 21-8339-U500), se transfirió a 3 botellas de cultivo de  $75 \text{ cm}^2$  con 18 mL cada una y se incubó (Thermo Fisher Scientific, EE. UU., REF 4110) a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Al día 4 se añadieron nuevamente IL-4 y GM-CSF a la misma concentración.

Al día 6 se recuperó el medio de cultivo en un tubo Falcon de 50 mL, se centrifugó a 1600 rpm, 20°C durante 10 minutos, se resuspendió el botón celular en RPMI completo, se hizo una dilución 1:10 con azul tripano para contar las DC en una cámara Neubauer, se ajustó el volumen con RPMI completo para tener una densidad celular de  $10^6$  DC/mL de medio y se añadió IL-4 y GMCSF.

### **7.1.2.1 Estimulación de DC**

#### **7.1.2.1.1 Estimulación con LPS y coctel de maduración de DC**

De la suspensión de DC, se transfirieron  $1.5 \times 10^6$  DC a 8 pozos de placas de 12 pozos (Corning, EE. UU., REF 3513) (WB) y  $0.9 \times 10^6$  DC a 3 pozos de placas de 12 pozos (IF), se les añadieron los estímulos correspondientes: LPS (10  $\mu$ g/mL) (Sigma Aldrich, EE. UU., L4391) y un CM: TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) (Biolegend, EE. UU., REF 570106), IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) (Biolegend, EE. UU., REF 579406) y PGE2 (1 mg/mL) (Sigma, EE. UU., P0409) durante los tiempos establecidos: 2, 6 12 y 24 horas para WB; 15 minutos, 2 y 24 horas para IF. Se cosecharon las mDC para WB y las mDC para IF se resuspendieron en RPMI completo a una densidad de  $3 \times 10^5$  DC/60  $\mu$ L. Se cosecharon  $3 \times 10^6$  iDC para WB y se resuspendieron  $1.5 \times 10^6$  iDC para IF.

#### **7.1.2.1.2 Inducción de fagocitosis en DC**

De la suspensión de DC, se transfirieron  $1.5 \times 10^6$  DC a 8 pozos de placas de 12 pozos (Corning, EE. UU., REF 3513) (WB) y se les añadieron los estímulos correspondientes: *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra muerta por calor (HKMtb) (10 bacterias/célula) (ATCC, EE. UU., REF ATCC-25177), la cual favorece mayormente una fagocitosis mediada por receptor de complemento 3 y *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra viva (10 bacterias/célula) la cual favorece mayormente un reconocimiento a través de TLR 2, 4 y 9, durante los tiempos establecidos: 2, 6 12 y 24 horas. Se

cosecharon las mDC para WB y las mDC para IF se resuspendieron en RPMI completo a una densidad de  $3 \times 10^5$  DC/60  $\mu$ L.

### **7.1.3 Diferenciación a MA**

Para WB, de la suspensión de MO se tomaron  $18.945 \times 10^6$  MO, se transfirieron a un tubo de 50 mL, se ajustó el volumen a 45 mL, se le añadió GMCSF (10ng/mL), se transfirieron a 15 pozos de 3 placas de 6 pozos (Corning, EEUU, REF 3516), 3 mL ( $1.263 \times 10^6$  CD14<sup>+</sup>) a cada pozo; para IF, de la suspensión de MO se tomaron  $1.5 \times 10^6$  CD14<sup>+</sup>, se transfirieron a un tubo de 15 mL, se ajustó el volumen a 6 mL, se le añadió GMCSF (10ng/mL), se transfirieron a 6 pozos con un cubreobjetos (Daigger Brand, EE. UU. REF G15973A) de una placa de 24 pozos (Corning, EE. UU. REF 3526), 1 mL ( $2.5 \times 10^5$  CD14<sup>+</sup>) a cada pozo y se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. A los días 3 y 5 se añadió nuevamente GMCSF a la misma concentración a los medios de cultivo y al día 8 ya se encontraron como MA diferenciados.

#### **7.1.3.1 Estimulación de MA**

##### **7.1.3.1.1 Estimulación con LPS de MA**

En 4 pozos para WB y 3 para IF se añadió el estímulo de LPS (10  $\mu$ g/mL), durante los tiempos establecidos: 2, 6 12 y 24 horas para WB; 15 minutos, 2 y 24 horas para IF y se cosecharon los MA para WB y a las muestras de MA para IF se les retiró el medio de cultivo, se realizaron 2 lavados con 500  $\mu$ L de PBS 1X estéril cada uno, dejando el segundo lavado. Se apartaron 3 pozos de MA sin estímulo para WB e IF.

### **7.1.3.1.2 Inducción de fagocitosis en MA**

En 8 pozos para WB se añadieron los estímulos correspondientes: *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra muerta por calor (10 bacterias/célula) la cual favorece mayormente una fagocitosis mediada por receptor de complemento 3 y *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra viva (10 bacterias/célula) la cual favorece mayormente un reconocimiento a través de TLR 2, 4 y 9, durante los tiempos establecidos: 2, 6 12 y 24 horas y se cosecharon los MA.

## **7.2 Evaluación de la expresión de las proteínas por Western Blot**

### **7.2.1 Lisis y cuantificación de proteína total de las muestras**

Se lisaron las células resuspendiendo en disolución RIPA (Sigma Aldrich, Alemania, REF R0278) con un coctel de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich, Alemania, P8340) y se incubaron en hielo durante 15 minutos. Se centrifugó a 14 000 rpm, 4°C durante 15 minutos y se recuperaron los sobrenadantes. Se cuantificó la proteína total con el estuche comercial BioRad DC™ Protein Assay (BioRad, EE. UU., REF 5000112). En una placa para ELISA se añadieron por duplicado 5 µL de muestra por pozo o 5 µL de una curva de calibración elaborada con albúmina sérica bovina (BSA) (Calbiochem, EE. UU., REF 126593) en disolución RIPA a distintas concentraciones. Se añadieron a cada pozo 25 µL del reactivo AS y 200 µL del reactivo B, se incubó a T.A. durante 15 minutos y después se leyó en un lector de absorbancia de microplacas (BioRad, EE. UU., REF 1681135) a 750 nm.

Se realizó una regresión lineal de la curva de calibración y se calculó la concentración de proteína total de cada una de las muestras.

### 7.2.2 Western Blot

Se les añadió a las muestras la disolución de carga 6x (Anexo I), y se incubó a 95°C durante 5 minutos (Labnet, EE. UU., REF I-4001-HCS). Se centrifugó de manera rápida para recuperar el volumen evaporado y se cargó la misma cantidad de proteína de cada una de las muestras por pozo (40 µg) y un marcador de peso molecular (BioRad, EE. UU., REF 1610374) en un gel de poliacrilamida al 12% (Anexo I).

Se realizó la electroforesis en disolución de electroforesis (Anexo I) a voltaje constante, 85 V mientras las muestras recorrieron el gel concentrador (Anexo I) y una vez que entraron al gel separador se aumentó a 130 V por aproximadamente 1:30 h. Las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, EE. UU., REF 1620112) a 100 V en disolución de transferencia (Anexo I) por una hora. La membrana se bloqueó con leche descremada (Kroger) al 5% en TBS 1X (Anexo I), durante 1 hora en agitación constante.

La membrana bloqueada se lavó con TBS-T (Anexo I) y se incubó con el anticuerpo primario  $\alpha$ -Lin7A (Genetex, EE. UU. REF GTX631107 o Invitrogen, EE. UU. REF PA5-30871) 1:500 durante toda la noche a 4°C en agitación constante, se lavó la membrana con TBS-T por 10 minutos 3 veces, se incubó con el anticuerpo secundario  $\alpha$ -IgG de ratón acoplado a HRP (Cell Signaling, EE. UU., REF 7076) para el anticuerpo primario de Genetex o con el anticuerpo secundario  $\alpha$ -IgG de conejo acoplado a HRP (Cell Signaling, EE. UU., REF 7074) para el anticuerpo primario de Invitrogen, ambos 1:2000 durante una hora a T.A. en agitación constante, se lavó nuevamente la membrana con TBS-T por 10 minutos 3 veces y se reveló utilizando luminol (Millipore, EE. UU., REF WBKLS0100), ya que es catalizado por la HRP en el anticuerpo secundario y con la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para emitir luz, la cual fue captada con el equipo Chemidoc XRS+ (BioRad, EE. UU.)

Como control de carga se reveló la proteína GAPDH o  $\beta$ -actina. La membrana se incubó con el anticuerpo primario  $\alpha$ -GAPDH (Genetex, EE. UU., GTX627408) 1:3000 o  $\beta$ -actina (donación) 1:5000 durante toda la noche a 4°C en agitación constante, se lavó como ya se mencionó, se incubó con el anticuerpo secundario  $\alpha$ -IgG de ratón acoplado a HRP (Cell Signaling, EE. UU., REF 7076) 1:2000 durante una hora a T.A. en agitación

constante, se lavó nuevamente la membrana y se revela utilizando luminol con el equipo Chemidoc XRS+

Finalmente, se hizo un análisis densitométrico de cada una de las bandas de los carriles con su control de carga con el programa Image Lab 6.1, una normalización y un análisis estadístico de los datos obtenidos con el programa GraphPad Prism 7.00 y se determinó si la expresión de Lin7A aumenta o disminuye con los estímulos aplicados en DC y MA.

### **7.3 Evaluación de la localización subcelular de las proteínas por Inmunofluorescencia**

#### **7.3.1 Tratamiento de cubreobjetos con poli-DL-lisina y adhesión de DC**

Se colocó un cubreobjetos estéril por pozo en una placa de 24 pozos, se añadieron 400  $\mu$ L de poli-DL-lisina (Sigma Aldrich, Alemania, P41-58) 0.01% a cada pozo asegurándose de cubrir totalmente el cubreobjetos y se incubó a 4°C durante toda la noche. Se recupera la poli-DL-lisina y se realizaron 2 lavados con 500  $\mu$ L de agua estéril cada uno y se dejó secar los cubreobjetos en un ambiente estéril. Una vez secos, se añadieron 60  $\mu$ L de la suspensión de DC para IF en el centro de cada cubreobjetos, se incubó durante 20 minutos a T.A., se retiró el medio de cultivo y se realizaron 2 lavados con 500  $\mu$ L de PBS 1X estéril cada uno, dejando el segundo lavado.

#### **7.3.2 Fijación de las muestras de DC y MA**

Se retiró el PBS 1X de los pozos, se añadieron 500  $\mu$ L de MeOH (Hycel, México, REF 912) frío, se incubaron exactamente 4 minutos, se retiró el MeOH, se realizaron 2 lavados con 500  $\mu$ L de PBS 1X estéril cada uno, dejando el segundo lavado y se guardaron a 4°C hasta que se realizó la IF.

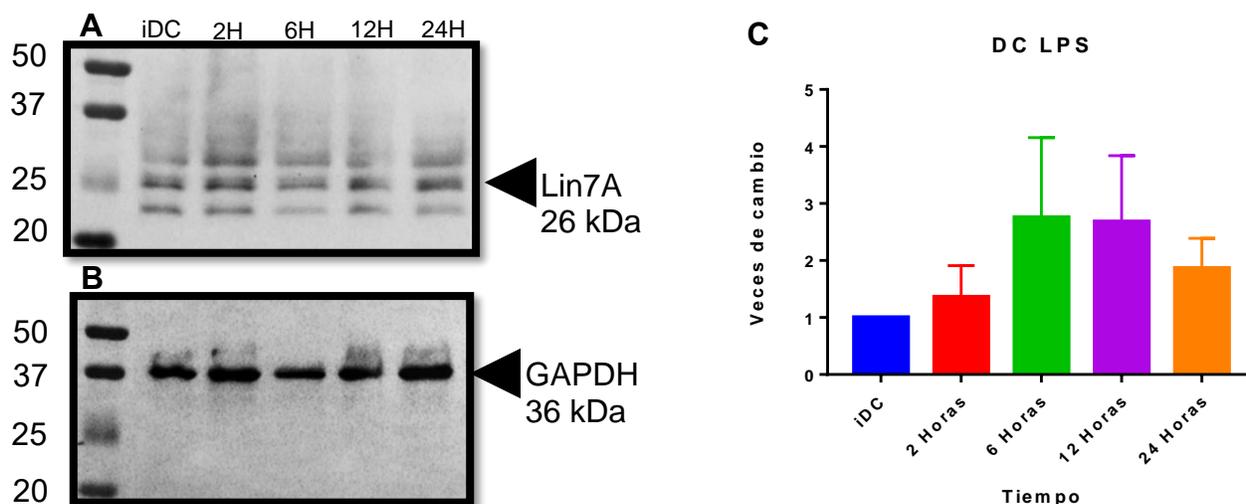
### 7.3.3 Inmunofluorescencia

Con unas pinzas se retiró el cubreobjetos del pozo y se colocó sobre Parafilm (Bemis, EE. UU.) con las células hacia arriba. Las células previamente fijadas con metanol se bloquearon con 60  $\mu$ L de disolución de bloqueo Cell Staining (BioLegend, EE. UU., REF 420201) durante 20 minutos. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con 60  $\mu$ L de disolución de lavado para IF (Anexo I), se incubaron con 60  $\mu$ L del anticuerpo primario  $\alpha$ -Lin7A (Invitrogen, EE. UU. REF PA5-30871) diluido en disolución de bloqueo Cell Staining durante 1 hora y se realizaron 3 lavados con 60  $\mu$ L de disolución de lavado para IF. Se incubaron con 60  $\mu$ L del anticuerpo secundario  $\alpha$ -IgG de conejo acoplado al fluoróforo CY3 (Jackson ImmunoResearch, EE. UU. REF 711-165-152) diluido en disolución de bloqueo Cell Staining: 1:1200 durante 1 hora y se realizaron 3 lavados con 60  $\mu$ L de disolución de lavado para IF. Se incubaron con 60  $\mu$ L de DAPI (Invitrogen, EE. UU., REF R37606) (4 gotas de DAPI por cada 1mL de PBS 1X) durante 30 minutos, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X y se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos (Velab, EE. UU., VE-P30) usando el medio de montaje Prolong Glass (Invitrogen EE. UU., REF P26980). Se guardaron en oscuridad a T.A. durante 48 horas y posteriormente a 4°C hasta que fueron observados en el microscopio confocal.

## 8. Resultados

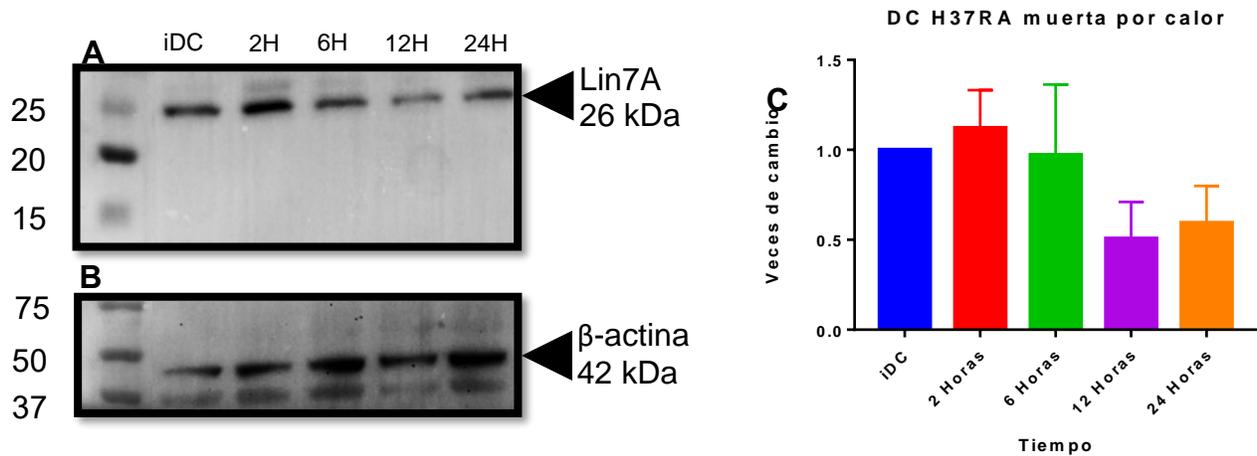
### 8.1 Cambio en la expresión de Lin7A en DC

Con las DC estimuladas con LPS se observa una tendencia al aumento en la expresión de Lin7A, aunque no es estadísticamente significativo. Existe un pico entre las 6 y 12 horas de tres veces de cambio, para que a las 24 horas comience a regresar al basal (Figura 10). A ningún tiempo con respecto al control, sin embargo, hay una tendencia al aumento de la expresión de Lin7A.



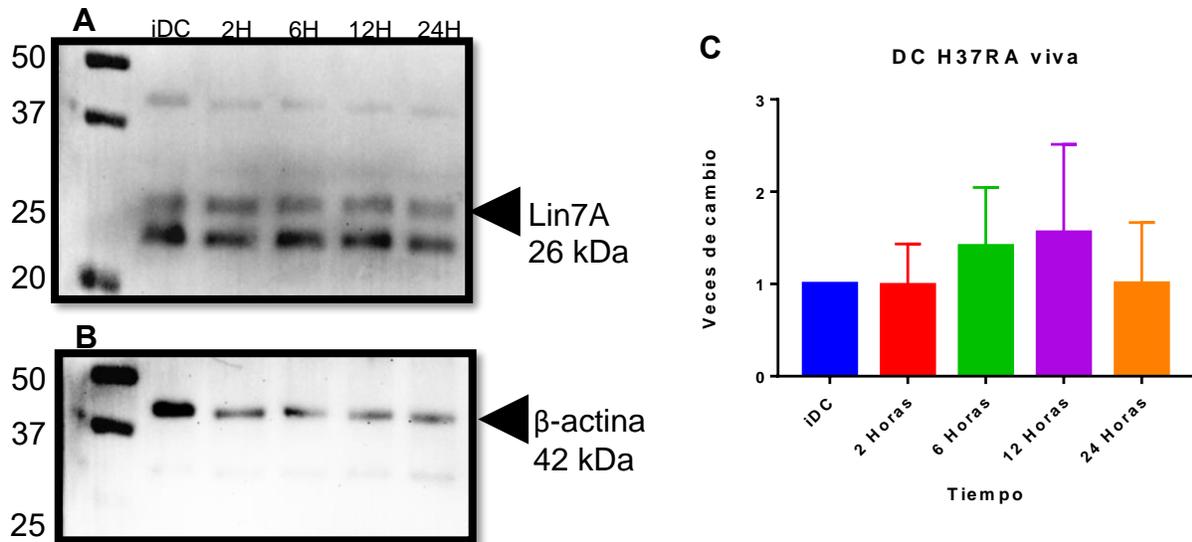
**Figura 10.** (A) Imagen representativa de cinco experimentos del cambio de la expresión de Lin7A en iDC y DC estimuladas con LPS en un curso de tiempo, (B) control de carga, GAPDH y (C) gráfico de los promedios de los análisis densitométricos de Lin7A normalizado al control de carga de los cinco experimentos, se muestran las barras del error estándar. No se observó diferencia significativa al realizar un ANOVA con un grado de confianza del 95% y una post-prueba de Dunnet.

En las DC estimuladas con HKMtb se observa una tendencia a disminuir la expresión de Lin7A, se observa únicamente un ligero aumento a las 2 horas y posteriormente disminuye su expresión a las 6 y 12 horas y a las 24 horas comienza a regresar a sus niveles basales (Figura 11). A ningún tiempo con respecto al control, sin embargo, hay una tendencia de disminución de la expresión de Lin7A hasta las 12 horas y a las 24 horas comienza a recuperarse.



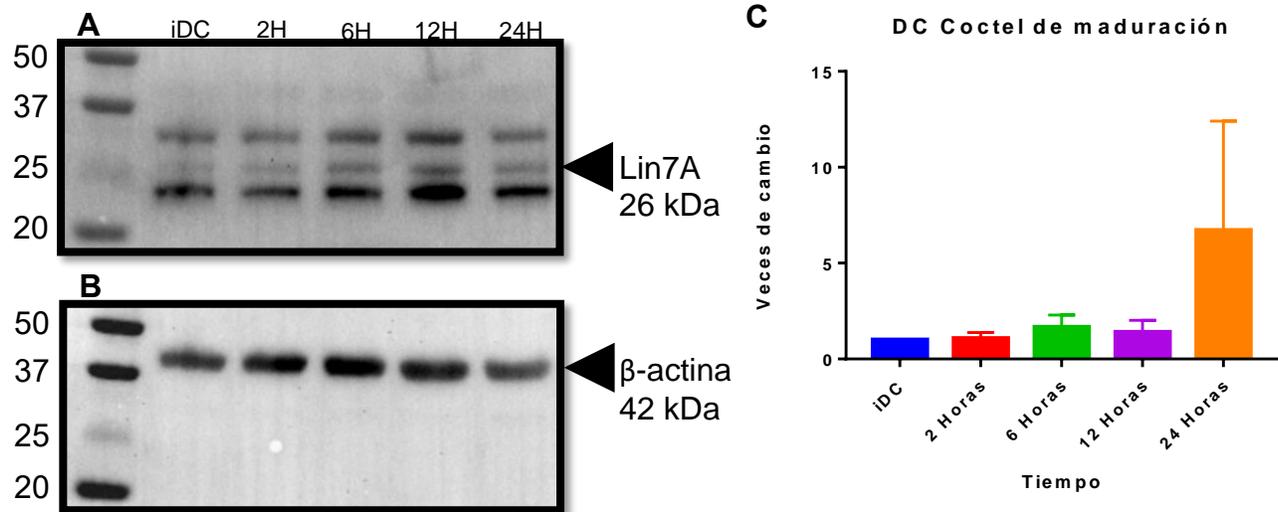
**Figura 11.** (A) Imagen representativa de tres experimentos del cambio en la expresión de Lin7A en iDC y DC estimuladas con HKMtb en un curso de tiempo, (B) control de carga, GAPDH y (C) gráfico de los promedios de los análisis densitométricos de Lin7A normalizado al control de carga de los tres experimentos, se muestran las barras del error estándar. No se observó diferencia significativa al realizar un ANOVA con un grado de confianza del 95% y una post-prueba de Dunnet.

En las DC estimuladas con H37Ra viva se observa una tendencia a aumentar la expresión de Lin7A, aunque no hay diferencia estadísticamente significativa. A las 12 horas se encuentra su pico de mayor expresión y a las 24 horas comienza a regresar al nivel basal (Figura 12). A ningún tiempo con respecto al control, sin embargo, hay una tendencia al aumento de la expresión de Lin7A.



**Figura 12.** (A) Imagen representativa de cuatro experimentos del cambio en la expresión de Lin7A en iDC y DC estimuladas con H37Ra viva en un curso de tiempo, (B) control de carga,  $\beta$ -actina y (C) gráfico de los promedios de los análisis densitométricos de Lin7A normalizado al control de carga de los cuatro experimentos, se muestran las barras del error estándar. No se observó diferencia significativa al realizar un ANOVA con un grado de confianza del 95% y una post-prueba de Dunnet.

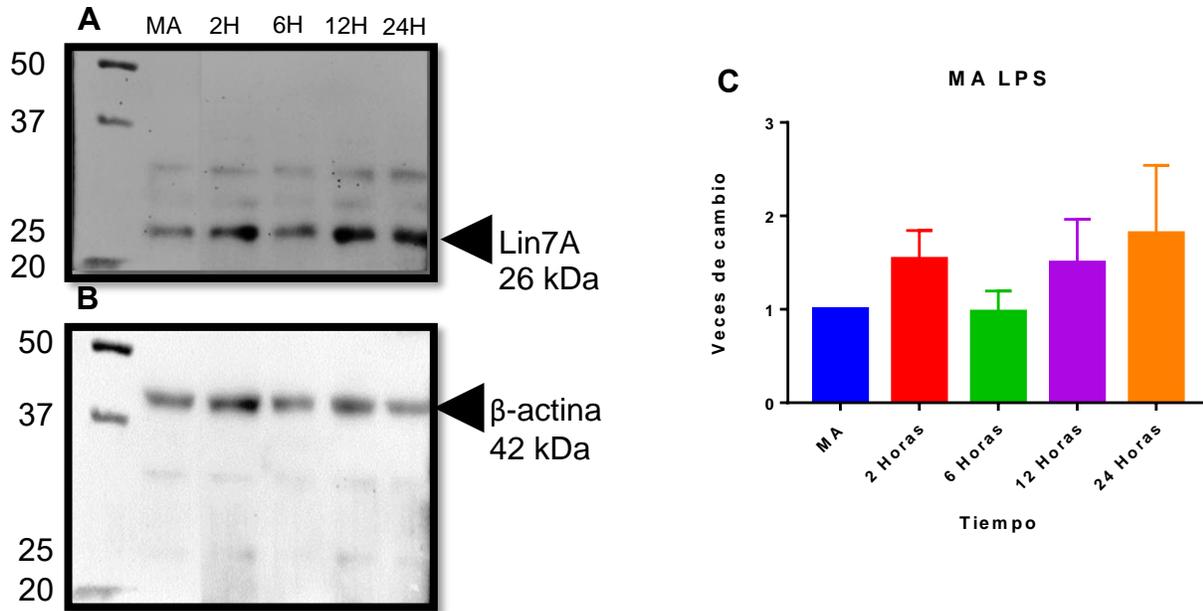
Las DC estimuladas con el CM tienen una tendencia a aumentar su expresión de Lin7A, más marcado a las 24 horas. A ningún tiempo con respecto al control.



**Figura 13.** (A) Imagen representativa de cinco experimentos del cambio en la expresión de Lin7A en iDC y DC estimuladas con CM en un curso de tiempo, (B) control de carga,  $\beta$ -actina y (C) gráfico de los promedios de los análisis densitométricos de Lin7A normalizado al control de carga de los cinco experimentos, se muestran las barras del error estándar. No se observó diferencia significativa al realizar un ANOVA con un grado de confianza del 95% y una post-prueba de Dunnet.

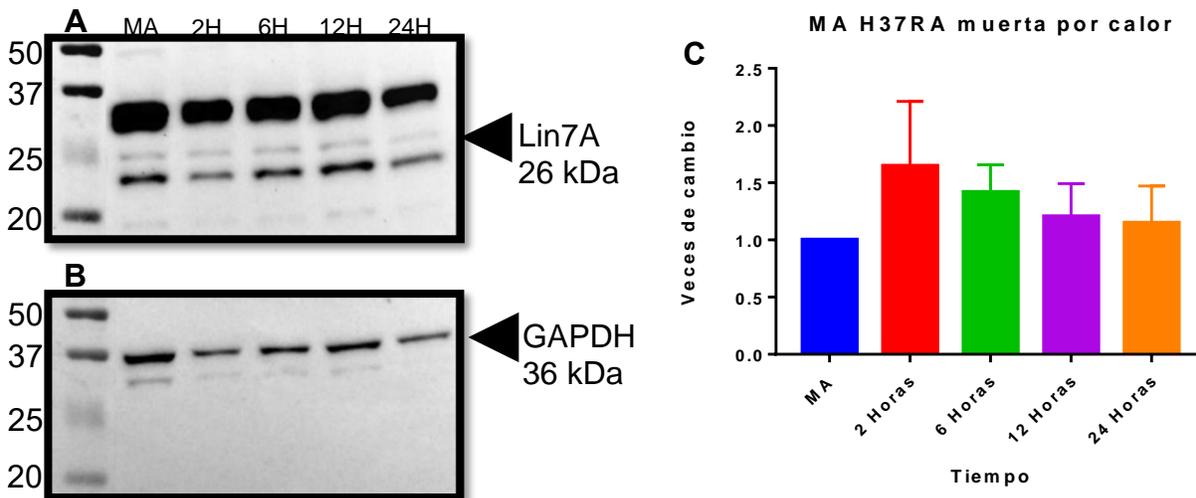
## 8.2 Cambio en la expresión de Lin7A en MA

En MA estimulados con LPS se observa una tendencia al aumento de la expresión de Lin7A, aunque no existe diferencia estadísticamente significativa. A ningún tiempo con respecto al control, sin embargo, hay una tendencia al aumento de la expresión de Lin7A.



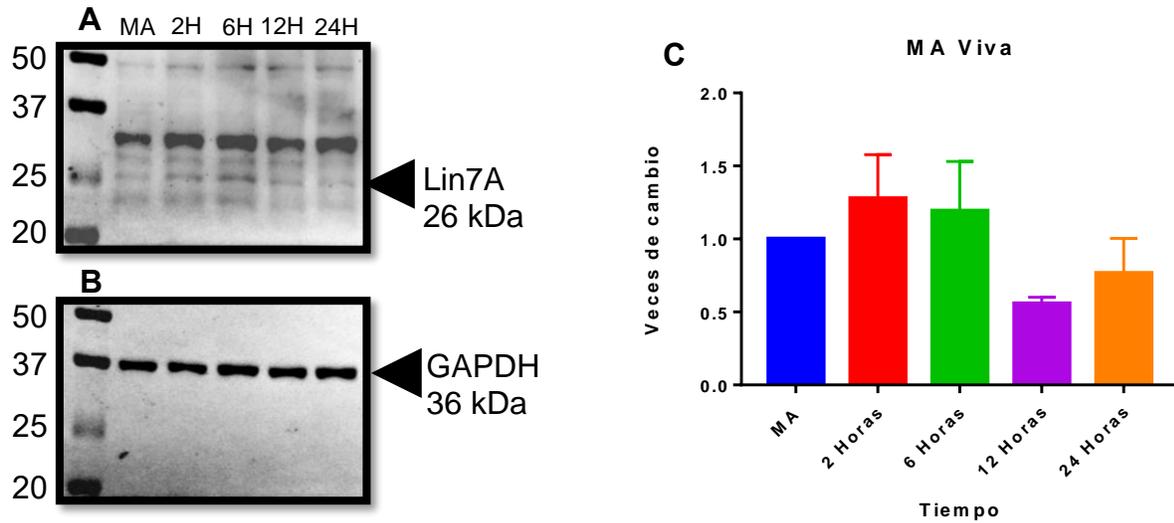
**Figura 14.** (A) Imagen representativa de ocho experimentos del cambio en la expresión de Lin7A en MA y MA estimulados con LPS en un curso de tiempo, (B) control de carga, GAPDH y (C) gráfico de los promedios de los análisis densitométricos de Lin7A normalizado al control de carga de los ocho experimentos, se muestran las barras del error estándar. No se observó diferencia significativa al realizar un ANOVA con un grado de confianza del 95% y una post-prueba de Dunnet.

En MA estimulados con HKMtb se observa un rápido aumento de la expresión de Lin7A a las 2 horas, pero sin diferencia estadísticamente significativa, y posteriormente comienza a regresar al nivel basal lentamente. A ningún tiempo con respecto al control.



**Figura 15.** (A) Imagen representativa de ocho experimentos del cambio en la expresión de Lin7A en MA y MA estimulados con HKMtb en un curso de tiempo, (B) control de carga, GAPDH y (C) gráfico de los promedios de los análisis densitométricos de Lin7A normalizado al control de carga de los ocho experimentos, se muestran las barras del error estándar. No se observó diferencia significativa al realizar un ANOVA con un grado de confianza del 95% y una post-prueba de Dunnet

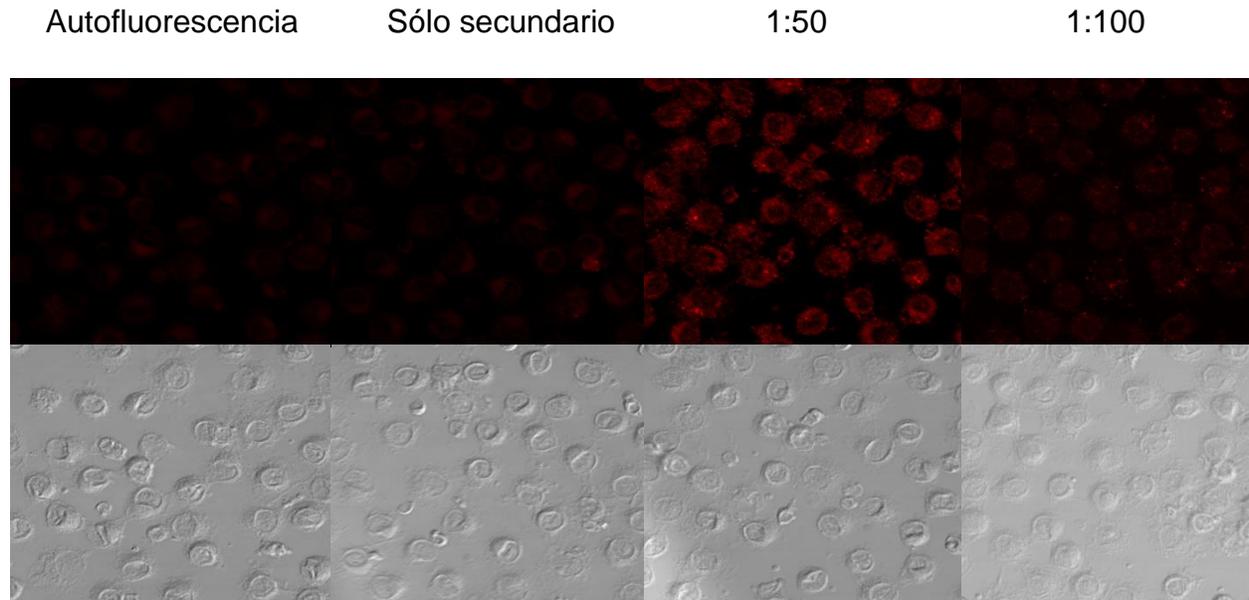
Con los MA estimulados con H37Ra viva se observa un leve incremento en la expresión de Lin7A a las 2 horas, posteriormente comienza a disminuir hasta las 12 horas cuando hay una menor expresión y a las 24 horas empieza a regresar a sus niveles basales. A ningún tiempo con respecto al control.



**Figura 16.** (A) Imagen representativa de cuatro experimentos del cambio en la expresión de Lin7A en MA y MA estimulados con H37Ra viva en un curso de tiempo, (B) control de carga, GAPDH y (C) gráfico de los promedios de los análisis densitométricos de Lin7A normalizado al control de carga de los cuatro experimentos, se muestran las barras del error estándar. No se observó diferencia significativa al realizar un ANOVA con un grado de confianza del 95% y una post-prueba de Dunnet.

### 8.3 Titulación del anticuerpo para Inmunofluorescencia

Se tituló el anticuerpo  $\alpha$ -Lin7A para determinar la dilución óptima a usarse tanto en DC como en MA. El anticuerpo secundario  $\alpha$ -IgG de conejo se utilizó a una dilución 1:1200. En la figura 17 se observa la titulación del anticuerpo  $\alpha$ -Lin7A en iDC, en la figura 18 se observa la titulación en mDC y en la figura 19 se observa se observa la titulación en MA. Se decidió utilizar la dilución del anticuerpo primario  $\alpha$ -Lin7A 1:50 para DC y 1:200 para MA.



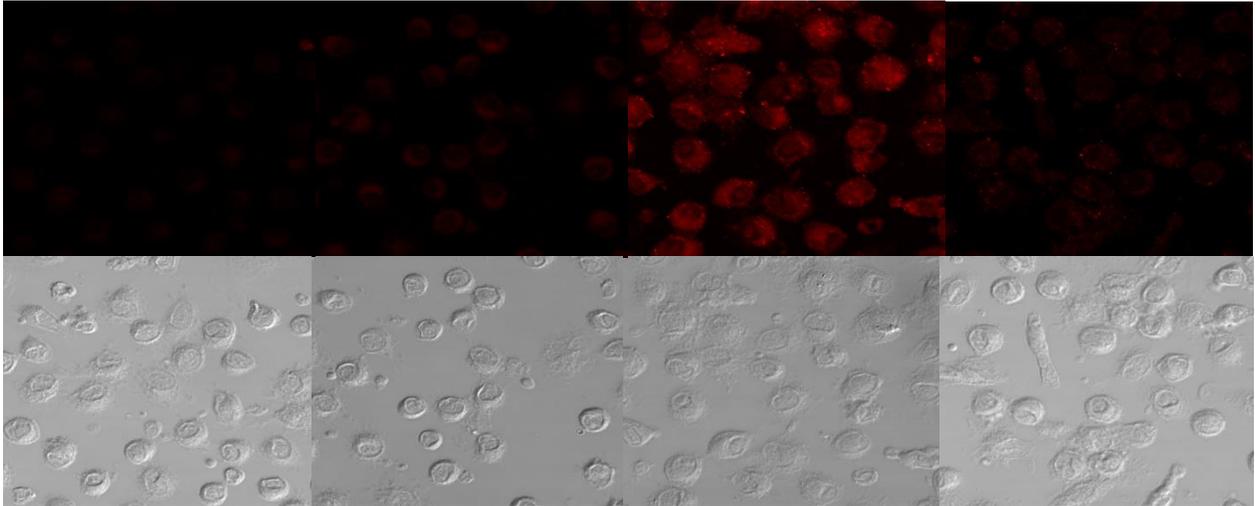
**Figura 17: Prueba de dos concentraciones del anticuerpo  $\alpha$ -Lin7A en iDC.** En el panel superior se muestra la expresión de Lin7A (rojo) a las diluciones que se indican y sus controles de autofluorescencia y con anticuerpo secundario únicamente, en el panel inferior se muestra el campo claro de las células.

Autofluorescencia

Sólo secundario

1:50

1:100



**Figura 18: Prueba de dos concentraciones del anticuerpo  $\alpha$ -Lin7A en mDC.** En el panel superior se muestra la expresión de Lin7A (rojo) a las diluciones que se indican y sus controles de autofluorescencia y con anticuerpo secundario únicamente en el panel inferior se muestra el campo claro de las células.

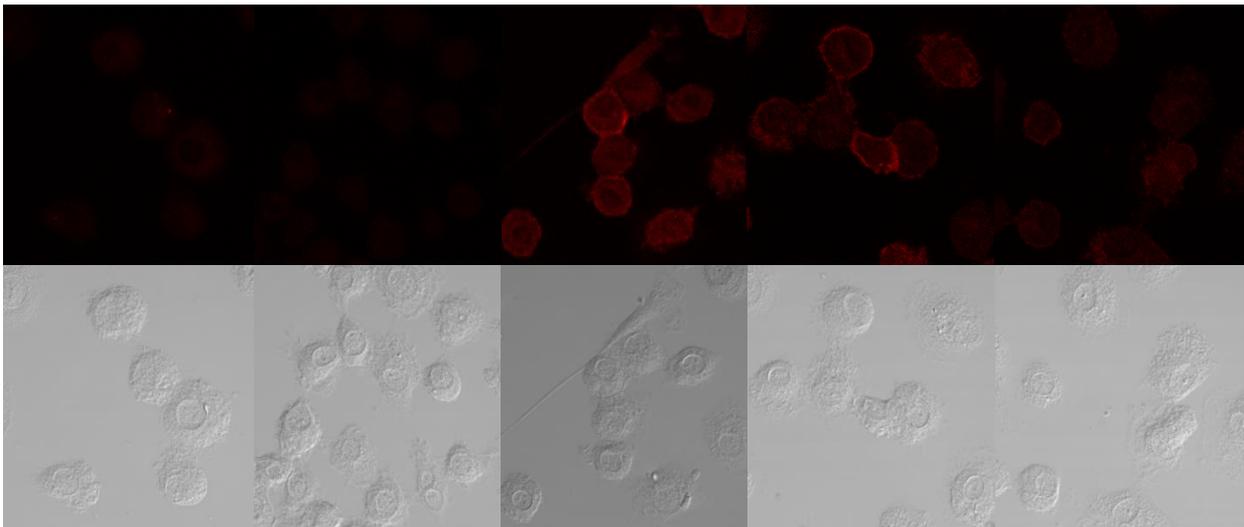
Autofluorescencia

Sólo secundario

1:100

1:500

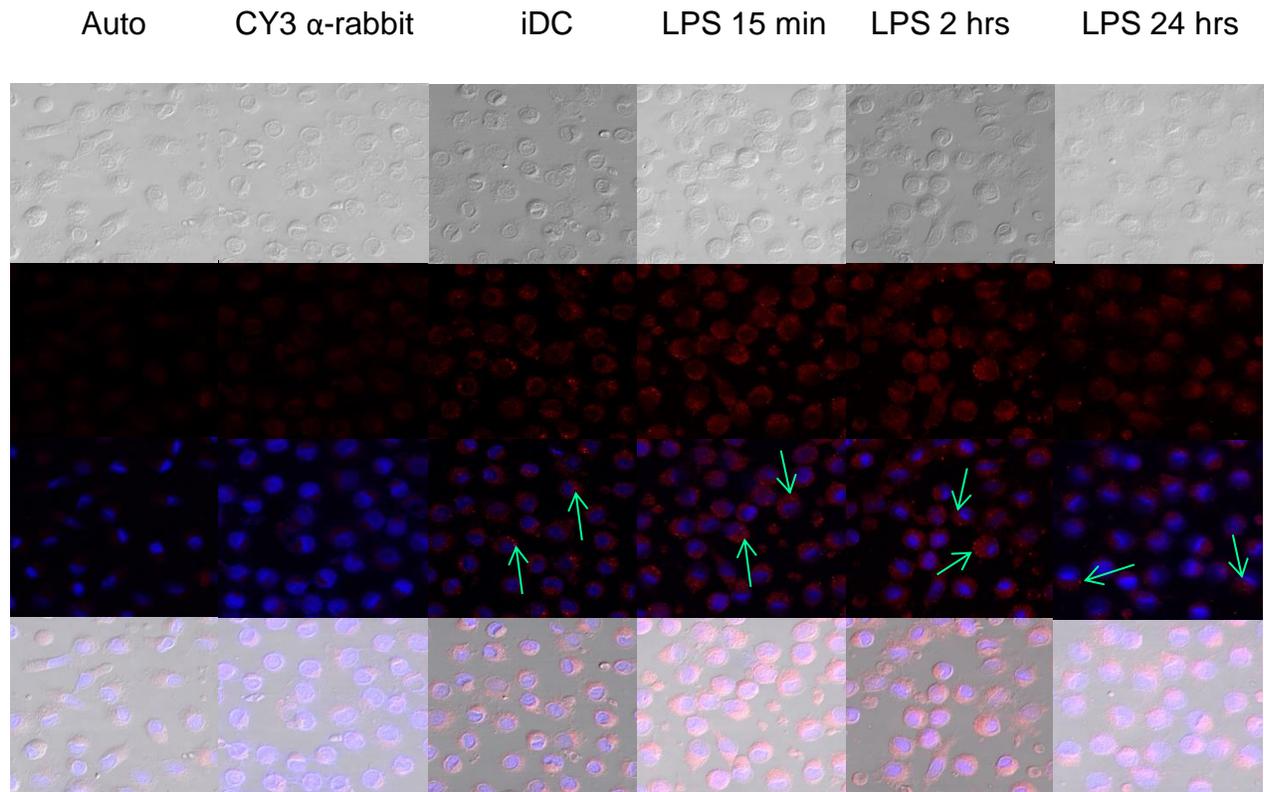
1:1000



**Figura 19: Titulación del anticuerpo  $\alpha$ -Lin7A en MA.** En el panel superior se muestra la expresión de Lin7A (rojo) a las diluciones que se indican y sus controles de autofluorescencia y con anticuerpo secundario únicamente en el panel inferior se muestra el campo claro de las células.

#### 8.4. Localización subcelular de Lin7A en DC

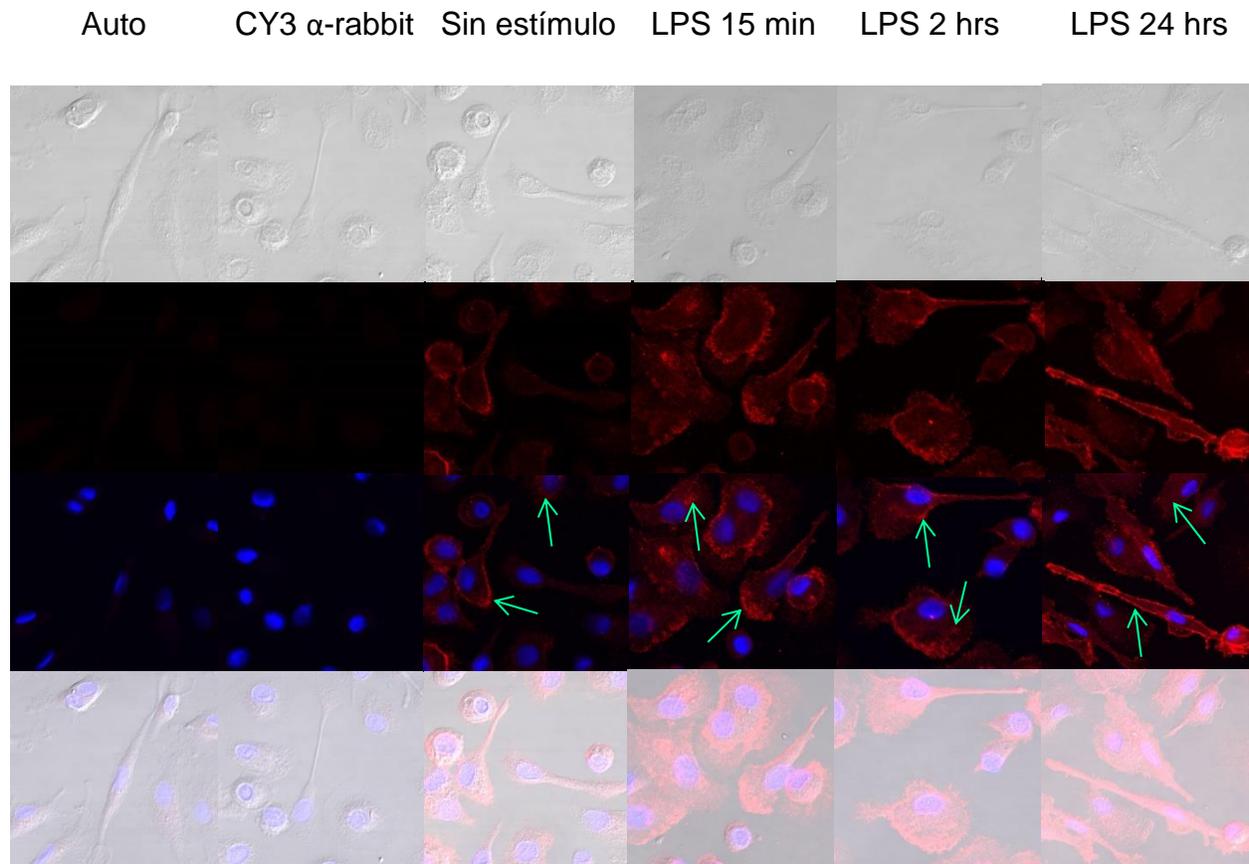
En la figura 20 se observa la expresión de Lin7A en DC. Su localización en iDC es mayormente vesicular en citoplasma y algunas cerca de lo que parece ser la membrana plasmática. Al estimular las células con LPS 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a los 15 minutos y 2 horas se ve un aumento en número y señal que emiten estas vesículas, a las 24 horas tras la estimulación disminuyen en número y señal estas vesículas. En los 3 individuos que se analizaron se observó un comportamiento muy similar.



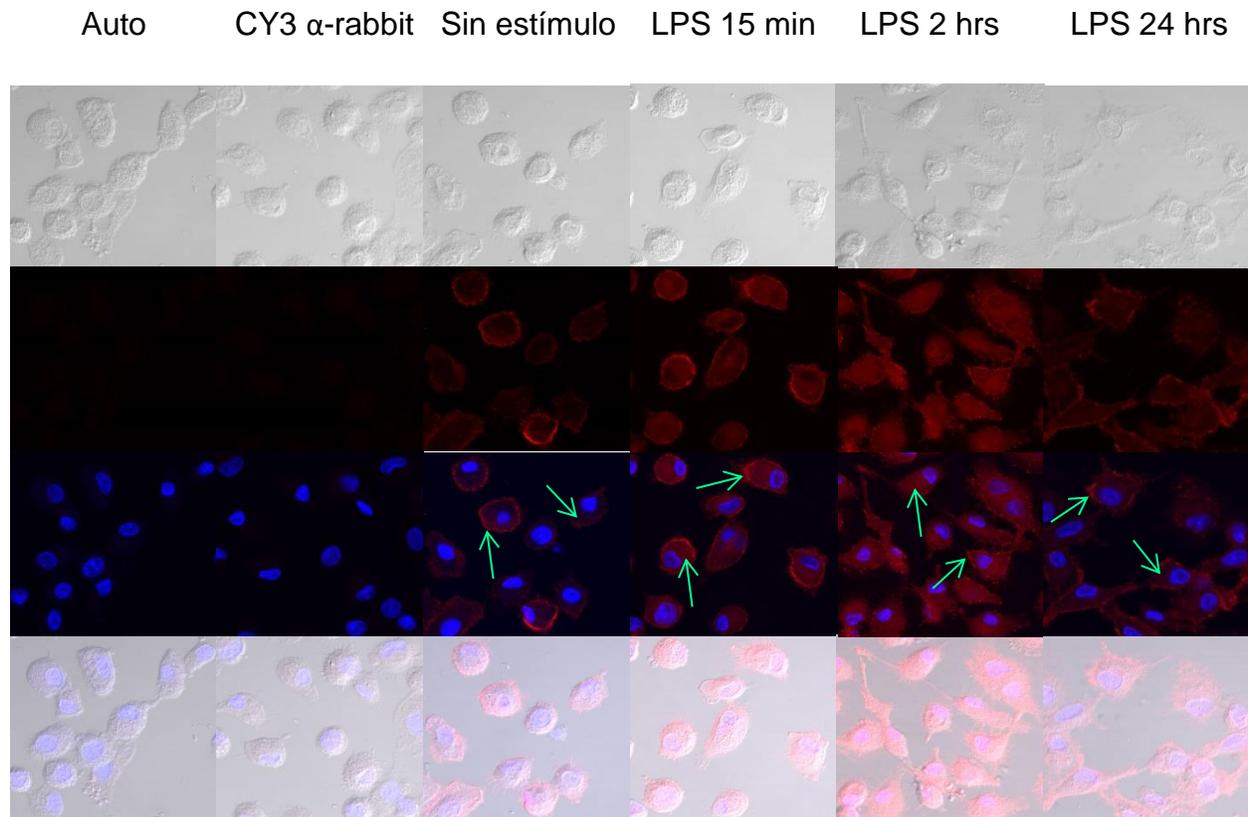
**Figura 20: Imagen representativa de tres experimentos del cambio en la localización intracelular de Lin7A en iDC y mDC estimuladas con LPS 10 en un curso de tiempo y sus controles de autofluorescencia y de anticuerpo secundario.** En el primer panel se muestra el campo claro de las células. En el segundo panel se muestra la expresión de Lin7A (rojo) en las células. En el tercer panel se muestra la superposición con DAPI (azul) que tiñe los núcleos de las células. En el cuarto panel se realiza la superposición de todos los paneles anteriores.

## **8.5. Localización subcelular de Lin7A en MA**

En los cinco experimentos realizados de MA se observó un poco de variabilidad entre los cinco individuos analizados, contrario a lo encontrado en DC. En la figura 21 se observa que Lin7A se expresa de manera basal mayormente en lo que parece ser la membrana citoplasmática y en menor medida en el citoplasma, su localización no cambia al ser estimulados con LPS, pero aumenta la señal emitida en lo que se cree que es la membrana citoplasmática y disminuye en el citoplasma. En la figura 22 se observa que Lin7A se expresa mayormente en lo que parece ser la membrana citoplasmática en los MA basales, al ser estimulados desde los 15 minutos y mayormente a las 2 horas, la señal de Lin7A se vuelve más intensa en el citoplasma y parece perderse en la membrana citoplasmática, pero a las 24 horas comienza a regresar al basal.



**Figura 21: Imagen representativa de cuatro experimentos del cambio en la localización intracelular de Lin7A en MA sin estímulo y MA estimuladas con LPS en un curso de tiempo y sus controles de autofluorescencia y de anticuerpo secundario.** En el primer panel se muestra el campo claro de las células. En el segundo panel se muestra la expresión de Lin7A (rojo) en las células. En el tercer panel se muestra la superposición con DAPI (azul) que tiñe los núcleos de las células. En el cuarto panel se realiza la superposición de todos los paneles anteriores.



**Figura 22: Cambio en la localización intracelular de Lin7A en MA sin estímulo y MA estimuladas con LPS 10 en un curso de tiempo y sus controles de autofluorescencia y de anticuerpo secundario.** En el primer panel se muestra el campo claro de las células. En el segundo panel se muestra la expresión de Lin7A (rojo) en las células. En el tercer panel se muestra la superposición con DAPI (azul) que tiñe los núcleos de las células. En el cuarto panel se realiza la superposición de todos los paneles anteriores.

## 9. Discusión

Lin7A es una proteína PDZ de 26 kDa que tiene función de andamiaje lo que le permite generar y mantener polaridad estructural anclando receptores y canales iónicos a la membrana celular participando en la transducción de señales; también es capaz de formar un complejo tripartito con CASK y Mint 1 permitiendo el correcto tráfico vesicular (Bastiano 2002; NIH; 2023; Seonok, 2002; Uniprot, 2023). Lin7A se ha estudiado mayormente en células epiteliales y especialmente en neuronas, donde se sabe que es necesaria para la correcta formación, mantenimiento y función de las sinapsis (Crespi, 2012; Matsumoto, 2014), pero poco se sabe de la función de esta proteína PDZ en células del sistema inmunológico. Recientemente en nuestro laboratorio se encontró que al exponer a DC a estímulos proinflamatorios y fagocíticos durante un intervalo de tiempo había una tendencia de aumento en la expresión del mRNA del gen de Lin7A, mientras que al exponer a MA a estímulos proinflamatorios y de fagocitosis en un curso de tiempo, la expresión del mRNA disminuye de manera estadísticamente significativa (Rosas 2022), lo cual nos llevó a pensar que la proteína Lin7A podría tener alguna función en estas CPA relacionada con las vías de señalización por PRRs, fagocitosis, formación de polaridades transitorias, entre otras.

Dados estos antecedentes, en este trabajo se analizó el cambio de expresión de la proteína Lin7A a través de WB y su localización subcelular por IF en DC y MA ya que conocer la modulación en la expresión de la proteína, así como su localización subcelular ante diferentes estímulos y cinéticas, podría darnos indicios de las funciones de esta proteína en estos dos tipos celulares.

Las DC al captar el LPS mediante TLR4 comienzan una cascada de señalización la cual culmina en la translocación al núcleo del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκB) y la producción de citocinas proinflamatorias (Hirayama, 2017; Re, 2001; Trask, 2012; Yesudhas, 2014), además de comenzar el proceso de maduración de la propia DC, el cual implica una serie de cambios morfológicos y fenotípicos como lo son el aumento en la expresión de MHC-II, la expresión de moléculas de coestimulación y secreción de citocinas (Min, 2019). En este contexto, Lin7A podría tener alguna función en la cascada de señalización por TLR4 y/o

en la maduración de la DC, ya que a pesar de que no hubo una diferencia estadísticamente significativa, hay una tendencia al aumento al estimular a estas células con LPS (Figura 10). Además, al analizar la localización subcelular de Lin7A en DC de manera basal (Figuras 17 y 20) y tras estimularlas con LPS (Figuras 18 y 20), se observa que esta distribución de Lin7A en puntilleo en el citoplasma, sugiriendo su localización en vesículas, y cuya señal aumenta tras el estímulo es parecida a las observaciones hechas por Barreda (2020) de la localización subcelular de la proteína PDZ Dlg1 en iDC y mDC, por lo que es posible que el complejo tripartito de Lin7A, Dlg1 y MPP7 descubierto in vitro en las uniones estrechas entre células epiteliales (Bohl, 2007) también se presente en DC. Sabiendo que Dlg1 es necesario para la correcta maduración de las DC, esto podría explicar el aumento en la expresión de Lin7A y su localización subcelular al estimular estas DC con LPS, pues se estaría uniendo a MPP7 y Dlg1 para que la DC pueda madurar correctamente, producir IL-6, secretar IL-12 y expresar CD-83 producto de la señalización por TLR4 y la traslocación de NFκB al núcleo (Barreda, 2020; Liu, 2017).

Las citocinas IL-1β y TNF-α contenidas en el coctel de maduración (CM) promueven la maduración de las DC y síntesis de más citocinas proinflamatorias (Blanco, 2008; Kaneko, 2019). Adicionalmente, PGE2 es una prostaglandina involucrada en madurar a la DC y estimular su movilidad al promover la expresión de CCR7 (Elke, 2002; Yan, 2019); por tanto, el CM genera un ambiente proinflamatorio en el medio de cultivo y así la maduración de las DC. El resultado obtenido de las DC estimuladas con CM es similar a aquellos donde hay un estímulo proinflamatorio vía TLR, pues hay una tendencia de aumento en la expresión de Lin7A (Figura 13). Esto concuerda, pues la señalización de IL-1β es capaz de activar la vía de la molécula de la respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88) (Kaneko, 2019) mientras que la señalización con TNF-α puede reclutar al modulador esencial de NFκB (NEMO) y así se lleva a cabo la producción de más citocinas (Gough, 2020), por lo que Lin7A podría estar implicada en esta cascada de señalización o en la exocitosis de citocinas y moléculas de coestimulación, probablemente en el trímero con MPP7 y Dlg1 (Bohl, 2007).

Respecto a los estímulos fagocíticos utilizados en este estudio, la micobacteria H37Ra muerta por calor (HKMtb) es fagocitada mayormente vía receptor de complemento (CR)3 (Rosas, 2022) , esto debido al tratamiento que se le da, pues al incubarse a 80°C durante 30 minutos, pierde la mayor parte del recubrimiento de glucolípidos que la recubren; posteriormente las micobacterias muertas se resuspenden en medio RPMI completo con suero fetal bovino (SFB) sin descomplementar, esto con el fin de que las micobacterias sean opsonizadas por las proteínas del complemento presentes en el SFB y puedan ser fagocitadas más fácilmente por las DC y MA, aunque la HKMtb también es reconocida por otros PRRs como lo son receptores de manosa o carroñeros (Pieters, 2008).

Por su parte, H37Ra viva se reconoce principalmente vía TLR2, 4 y 9 (Aderem, 2000; Chávez, 2009; Mayer, 2015; Sia, 2019) activando una cascada de señalización dependiente de la MyD88, la cual culmina en la traslocación al núcleo de NFκB, p38 y cinasas c-Jun N-terminal (JNK) lo que aumenta la producción de citocinas proinflamatorias (Caplan, 2018). Esto favorece la fagocitosis de las micobacterias vía múltiples receptores, principalmente por CR, pero también por receptores de manosa, receptores carroñeros y receptores de Fc, además de promover la maduración de los fagosomas y el estallido respiratorio en los mismos (Hossain, 2013; Pieters, 2008).

Nuestros resultados demostraron que la expresión de Lin7A en DC al estimularlas con HKMtb o H37Ra viva es muy distinto, Lin7A muestra una tendencia a disminuir su expresión ante el estímulo con HKMtb (Figura 11) mientras que, por el contrario, la expresión de Lin7A tienden a aumentar cuando se estimula con H37Ra viva (Figura 12). Esto coincide con las observaciones del resultado con LPS, pues en las DC que recibieron el estímulo vía TLR4 hay un aumento en la expresión de la proteína, mientras que en aquellas que no hay ese estímulo vía TLR, la expresión de Lin7A tiende a disminuir. Esto sugiere que Lin7A tiene un papel importante en la vía de señalización por TLRs y/o en la maduración y exocitosis de citocinas proinflamatorias o moléculas de coestimulación probablemente asociada a Dlg1 (Barreda, 2020; Bohl, 2007), sin embargo, parece ser que no desempeña un papel en el proceso de fagocitosis en DC.

La disminución en la expresión de Lin7A en las DC estimuladas con HKMtb se podría dar mediante regulación postraducciona l vía poliubiquitinación para posterior

degradación vía proteasoma (Guo, 2022), ya que Lin7A tiene un sitio de unión a ubiquitina en su residuo de aa, Lisina 76 (Jehl, 2016).

Nuestros resultados también mostraron que existe un aumento mayor en la expresión de Lin7A con los estímulos proinflamatorios que con la micobacteria viva en DC, esto puede deberse a mecanismos de evasión de la micobacteria ya que, a pesar de que H37Ra es una cepa avirulenta, se ha encontrado que puede proliferar dentro de MA y podría seguir ejerciendo algunos mecanismos de evasión (Hart, 1974; Heinrichs, 2018). Aunque aún no se comprenden del todo los mecanismos bioquímicos por los cuales se atenuó la cepa H37Ra (Zheng, 2008), es posible que aun conserve mecanismos que le ayuden a evadir la señalización por TLR2 como la síntesis del antígeno blanco de secreción temprana de 6 kDa (ESAT-6), el cual inhibe la señalización por TLR2 (Landry, 2017), lo cual ayudaría a explicar la menor expresión de Lin7A con el estímulo de H37Ra viva comparado con los estímulos proinflamatorios.

Al hablar de los MA, se conocen algunas proteínas PDZ que se necesitan para la activación y función de estas células como lo son PDLIM2, PDZK1 y Scrib (Cox, 2022; Sakarya, 2021; Sven, 2006; Zheng, 2016.), por lo que cabe la posibilidad que Lin7A también tenga alguna función en estas CPA. Al analizar los resultados obtenidos de los cambios en la expresión de Lin7A en los MA, se observa una tendencia al aumento de la expresión de Lin7A al ser estimulados con LPS (Figura 14). Por otro lado, respecto a la localización subcelular de Lin7A en MA, este mismo estímulo de LPS promueve la localización de Lin7A hacia lo que parece ser la membrana plasmática (Figura 21). Este aumento en la expresión de Lin7A y su localización predominante hacia la membrana plasmática sugiere que en estas células Lin7A tendría una posible función para la endocitosis o la formación de prolongaciones de la membrana tras la activación.

Se sabe que en células NSC34, las isoformas de Lin7 se necesitan para la correcta formación de filopodios y la generación de neuritas al interactuar con el sustrato del receptor de insulina de 53 kDa (IRSp53), donde Lin7 promueve la correcta formación de prolongaciones de actina (Crespi, 2012). A pesar de que IRSp53 no se expresa en células del sistema inmunológico (GeneCards, 2023), no se descarta la posibilidad de que Lin7A esté teniendo alguna función en la generación de protuberancias de la

membrana plasmática, incluso relacionada también con la polimerización de actina. En neuronas, la proteína de unión canónica de Lin7A, CASK, se puede unir a la proteína de membrana de eritrocitos banda 4.1 (EPB41), la cual promueve la formación de filamentos de actina (Biederer, 2001). EPB41 sí se expresa en células del sistema inmunológico, al igual que CASK (TheHumanProteinAtlas), por lo que es posible que alguna interacción entre estas tres proteínas ocurra en MA para promover la polimerización de filamentos de actina y, por consecuencia, la formación de pseudópodos y protuberancias de la membrana citoplasmática de los MA, pues nuestros resultados mostraron que Lin7A también se encuentra en dichas protuberancias membranales.

La activación del MA con LPS y la formación de prolongaciones de la membrana plasmática también promueven la capacidad fagocítica del macrófago (Mosser, 2008). Para iniciar el proceso de fagocitosis tras el reconocimiento del patógeno por los PRRs, hay una cascada de señalización que promueve la polimerización de actina (Uribe, 2020). Se ha demostrado que después de la elongación inicial de los pseudópodos y el aumento en la tensión de la membrana plasmática debida a la polimerización de actina, comienza un proceso de exocitosis de vesículas ricas en proteínas acopladas a glicosilfosfatidilinositol, con el propósito de aumentar el área superficial de la membrana citoplasmática y así hacer más eficiente la fagocitosis (Masters, 2013). Lin7A también podría estar involucrada en este proceso de exocitosis vesicular, ya que es una de sus funciones más conocidas en otros tipos celulares (Sanna, 2002; Stefan, 1998).

La expresión de Lin7A tuvo un comportamiento similar con ambos estímulos fagocíticos, HKMtb y H37Ra viva (Figuras 15 y 16). El pico de expresión a las 2 horas, que es más pronunciado con HKMtb, podría estar asociado a la función de promoción de polimerización de actina y/o exocitosis de vesículas de Lin7A, que le permita al MA endocitar a las micobacterias probablemente en un tiempo menor a dos horas, por lo que sería interesante a futuro analizar la expresión de Lin7A con estímulos de fagocitosis en tiempos más cortos.

También se realizaron algunos experimentos pareados. Las DC y MA de tres individuos fueron estimulados ambos con LPS, en estos tres individuos la expresión de Lin7A en DC tras el estímulo tiende a aumentar, mientras que en los MA de estos mismos tres

individuos la expresión de la proteína tiende a disminuir. De igual manera se analizaron DC estimuladas con HKMtb y CM de otros tres individuos. En dos individuos, las DC estimuladas con HKMtb la expresión de Lin7A tiende a disminuir y con el CM tiende a aumentar, mientras que en el otro individuo el comportamiento fue al contrario. Finalmente, se parearon tres individuos más de MA estimulados con LPS y HKMtb. En cuanto a los MA estimulados con LPS, sólo uno tiende a disminuir y los otros dos tienden a aumentar la expresión de Lin7A, mientras que en los 3 individuos al estimularlos con HKMtb tienden a aumentar su expresión de la proteína.

Estos resultados sugieren que un mismo estímulo, como LPS puede inducir efectos contrarios en la expresión de Lin7A entre DC y MA. Por otro lado, también sugieren que Lin7A está teniendo comportamiento distinto entre individuos, tipos celulares y estímulos, por lo que sería interesante realizar más experimentos pareados para comparar de mejor manera cómo cambia la expresión de Lin7A en las CPA de los mismos individuos ante distintos estímulos.

Al estimular MA con LPS y HKMtb, la expresión del mRNA de Lin7A disminuye de manera estadísticamente significativa (Rosas, 2022), sin embargo, en esta tesis se encontró que la expresión de la proteína Lin7A en MA con ambos estímulos tiende a aumentar. Esta diferente regulación entre mRNA y proteína puede deberse a que existen diferentes mecanismos de regulación de proteínas a niveles transcripcionales y traduccionales (Casamassimi, 2019; García, 2017; Wang, 2014). Se sabe que Lin7A tiene un sitio para ubiquitinación y 2 sitios para fosforilación (Jehl, 2016) por lo que un aumento o disminución en los niveles de expresión de mRNA, no equivalen necesariamente a un cambio proporcional en la proteína, ya que es altamente probable que la proteína Lin7A se esté regulando por alguna de estas modificaciones traduccionales.

Dado que se trabajó con población humana abierta, esto implica una gran variabilidad en los resultados debido a todas las variaciones genéticas y epigenéticas que la población puede tener (Bergström, 2020; Bonaguro, 2022; Carja, 2017), posiblemente por ello, aunque se encontraron tendencias, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre ningún tiempo de ningún estímulo. Sería interesante aumentar el número de experimentos de WB para determinar si existen o no diferencias significativas

en los cambios de la expresión de Lin7A en DC y MA ante distintos estímulos proinflamatorios y fagocíticos. Por otro lado, también sería importante realizar los experimentos de IF en DC y MA expuestos a los estímulos proinflamatorios y de fagocitosis, además del LPS, para conocer el cambio en la localización subcelular de Lin7A ante estos estímulos; asimismo sería relevante hacer co-tinciones para determinar con certeza el compartimento subcelular donde se encuentra Lin7A en estas CPA y si Lin7A está asociada a Dlg1 y MPP7 en DC o a CASK y EPB41 en MA.

## 10. Conclusiones

La proteína Lin7A está presente en DC, bajo los estímulos proinflamatorios su expresión tiende a incrementar de manera tiempo dependiente y con el estímulo fagocítico por CR3 su expresión tiende a disminuir de manera tiempo dependiente. Tras el estímulo con LPS no cambia la localización subcelular de Lin7A con el tiempo, pero sí se aprecia un aumento en la señal emitida de las vesículas en citoplasma.

La proteína Lin7A está presente en MA, bajo el estímulo con LPS su expresión tiende a incrementar de manera tiempo dependiente y con los estímulos fagocíticos tiende a aumentar en tiempos tempranos mismos que regresan al estado basal. Tras el estímulo con LPS se observa un ligero cambio en la localización subcelular de Lin7A, un aumento en la señal emitida hacia la membrana plasmática y una disminución en la señal emitida en el citoplasma.

Los cambios en la expresión en DC y MA, obtenidos a partir de monocitos humanos, de la proteína PDZ Lin7A y su localización subcelular implica que esta proteína cumple funciones en las vías de señalización por PRRs, tráfico vesicular y fagocitosis en estas CPA.

## 11. Referencias

1. Abbas, A. (2015). *Inmunología celular y molecular*. 8ª Ed.; España. Elsevier
2. Aderem, A., Ulevitch, R. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782–787 (2000). <https://doi.org/10.1038/35021228>
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Innate Immunity. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26846/>
4. Balan S, Saxena M, Bhardwaj N. Dendritic cell subsets and locations. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2019;348:1-68. doi: 10.1016/bs.ircmb.2019.07.004. Epub 2019 Sep 3. PMID: 31810551.
5. Barreda, D. Luis H. Gutiérrez-González, Erasmo Martínez-Cordero, Carlos Cabello-Gutiérrez, Rommel Chacón-Salinas, Teresa Santos-Mendoza, "The Scribble Complex PDZ Proteins in Immune Cell Polarities", *Journal of Immunology Research*, vol. 2020, Article ID 5649790, 12 pages, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/5649790>
6. Barreda D, Ramón-Luing LA, Duran-Luis O, Bobadilla K, Chacón-Salinas R, Santos-Mendoza T. Scrib andDlg1 polarity proteins regulate Ag presentation in human dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2020 Sep;108(3):883-893. doi: 10.1002/JLB.4MA0320-544RR. Epub 2020 Apr 15. PMID: 32293058.
7. Barreda D, Sánchez-Galindo M, López-Flores J, et al. PDZ proteins are expressed and regulated in antigen-presenting cells and are targets of influenza A virus. *J Leukoc Biol*. 2018;103:731–738. <https://doi.org/10.1002/JLB.4AB0517-184RDi>
8. Baruch Z. Harris, Wendell A. Lim. Mechanism, and role of PDZ domain in signaling complex assembly. *J Cell Sci*. 2001. 114(18): 3219-3231. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.18.3219>
9. Bastiano Sanna, Dana Kramer, Armando A. Genazzani, The Expression of the PDZ Protein MALS-1/Velis Is Regulated by Calcium and Calcineurin in Cerebellar Granule Cells\*, *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(51), <https://doi.org/10.1074/jbc.M207826200>. ISSN 0021-9258

10. Bergström Anders and Shane A. McCarthy and Ruoyun Hui and Mohamed A. Almarri and Qasim Ayub and Petr Danecek and Yuan Chen and Sabine Felkel and Pille Hallast and Jack Kamm and H el ene Blanch e and Jean-Fran ois Deleuze and Howard Cann and Swapan Mallick and David Reich and Manjinder S. Sandhu and Pontus Skoglund and Aylwyn Scally and Yali Xue and Richard Durbin and Chris Tyler-Smith. Insights into human genetic variation and population history from 929 diverse genomes. *Science*. 2020. 267(6484). doi={10.1126/science.aay5012}
11. Biederer T, Sudhof TC. CASK and protein 4.1 support F-actin nucleation on neuexins. *J Biol Chem*. 2001 Dec 21;276(51):47869-76. doi: 10.1074/jbc.M105287200. Epub 2001 Oct 16. PMID: 11604393.
12. Bio-techne; (2002); *Dendritic Cell Maturation*; recuperado el 17 de enero del 2023 de: <https://www.rndsystems.com/resources/articles/dendritic-cell-maturation>
13. Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008 Feb;19(1):41-52. doi: 10.1016/j.cytogfr.2007.10.004. PMID: 18258476; PMCID: PMC2413068.
14. Bohl, J. Nicole Brimer. Charles Lyons. Scott B. Vande Pol. The Stardust Family Protein MPP7 Forms a Tripartite Complex with LIN7 and DLG1 That Regulates the Stability and Localization of DLG1 to Cell Junctions. *Journal of Biological Chemistry*. 2007. 282(13). 9392-9400. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610002200>
15. Bonaguro Lorenzo, Jonas Schulte-Schrepping, Caterina Carraro, Laura L. Sun, Benedikt Reiz, Ioanna Gem und, Adem Saglam, Souad Rahmouni, Michel Georges, Peer Arts, Alexander Hoischen, Leo A.B. Joosten, Frank L. van de Veerdonk, Mihai G. Netea, Kristian H andler, Sach Mukherjee, Thomas Ulas, Joachim L. Schultze, Anna C. Aschenbrenner. Human variation in population-wide gene expression data predicts gene perturbation phenotype. *iScience*. 2022. 25(11). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105328>.
16. Casamassimi A, Ciccodicola A. Transcriptional Regulation: Molecules, Involved Mechanisms, and Misregulation. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 14;20(6):1281. doi: 10.3390/ijms20061281. PMID: 30875728; PMCID: PMC6471904.

17. Canton Marcella, Sánchez-Rodríguez Ricardo, Spera Iolanda, Venegas Francisca C., Favia Maria, Viola Antonella, Castegna Alessandra. Reactive Oxygen Species in Macrophages: Sources and Targets. *Frontiers in Immunology*. 2021. 12. DOI=10.3389/fimmu.2021.734229. ISSN=1664-3224
18. Caplan Ian F., Maguire-Zeiss Kathleen A. Toll-Like Receptor 2 Signaling and Current Approaches for Therapeutic Modulation in Synucleinopathies. *Frontiers in Pharmacology*. 2018. 9. DOI=10.3389/fphar.2018.00417
19. Carja O, Maclsaac JL, Mah SM, Henn BM, Kobor MS, Feldman MW, Fraser HB. Worldwide patterns of human epigenetic variation. *Nat Ecol Evol*. 2017 Oct;1(10):1577-1583. doi: 10.1038/s41559-017-0299-z. Epub 2017 Aug 28. PMID: 29185505; PMCID: PMC7580032.
20. Chávez, L. Arenas, M. Sada, I. Lascurain, R. Principales mecanismos de evasión de la respuesta inmune por *Mycobacterium tuberculosis*. *Gac Med Mex* 2009. 145(4) 323-330
21. Chow, A., Brown, B. & Merad, M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nat Rev Immunol* 11, 788–798 (2011). <https://doi.org/10.1038/nri3087>
22. Cox, O. T., O'Sullivan, N., Tresse, E., Ward, S., Buckley, N., & O'Connor, R. (2022). PDLIM2 is highly expressed in breast cancer tumour-associated macrophages and is required for M2 macrophage polarization. *Frontiers in oncology*, 12, [1028959]. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1028959>
23. Craven, Sarah E et al. PDZ Proteins Organize Synaptic Signaling Pathways. *Cell*, Volume 93, Issue 4, 495 – 498. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81179-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81179-4)
24. Crespi Arianna, Ilaria Ferrari, Paola Lonati, Andrea Disanza, Diego Fornasari, Giorgio Scita, Valeria Padovano, Grazia Pietrini. LIN7 regulates the filopodium- and neurite-promoting activity of IRSp53. *J Cell Sci*. 2012. 125(19) 4543-4554. <https://doi.org/10.1242/jcs.106484>
25. Dettmer, P. (2021); *IMMUNE. A Journey into the Mysterious System That Keeps You Alive*. New York. Random House

26. Di Nora A, De Costa G, Di Mari A, Montemagno M, Pavone V, Pavone P. A New 12q21 Deletion Syndrome: A Case Report and Literature Review. *Glob Med Genet.* 2022 Jul 21;9(3):214-218. doi: 10.1055/s-0042-1748171. PMID: 35873668; PMCID: PMC9303074.
27. Dmitri Leonoudakis. Lisa R. Conti. Carolyn M. Radeke. Leah M.M. McGuire. Carol A. Vandenberg. A Multiprotein Trafficking Complex Composed of SAP97, CASK, Veli, and Mint1 Is Associated with Inward Rectifier Kir2 Potassium Channels. *Journal of Biological Chemistry.* 2004. 279(18). 19051-19063. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400284200>
28. Elke Scandella, Ying Men, Silke Gillessen, Reinhold Förster, Marcus Groettrup; Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2002; 100 (4): 1354–1361. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2001-11-0017>
29. Fanning, Alan S., AND James Melvin Anderson. PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *The Journal of Clinical Investigation.* 1999. 103(6). 767-772. doi=10.1172/JCI6509
30. Farkas Zsolt. et. al. The nucleoside diphosphate kinase NDK.1/NME1 promotes phagocytosis in concert with DYN-1/Dynamin. *The FASEB Journal.* 2019. 33.
31. Ferrari, I., et al., Novel localisation and possible function of LIN7 and IRSp53 in mitochondria of HeLa cells. *Eur. J. Cell Biol.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.05.001>
32. Fu YL and Harrison RE (2021) Microbial Phagocytic Receptors and Their Potential Involvement in Cytokine Induction in Macrophages. *Front. Immunol.* 12:662063. doi: 10.3389/fimmu.2021.662063
33. Gallardo R, Ivarsson Y, Schymkowitz J, Rousseau F, Zimmermann P. Structural diversity of PDZ-lipid interactions. *Chembiochem.* 2010 Mar 1;11(4):456-67. doi: 10.1002/cbic.200900616. PMID: 20091728.
34. García-Mauriño SM, Rivero-Rodríguez F, Velázquez-Cruz A, Hernández-Vellisca M, Díaz-Quintana A, De la Rosa MA and Díaz-Moreno I (2017) RNA Binding Protein Regulation and Cross-Talk in the Control of AU-rich mRNA Fate. *Front. Mol. Biosci.* 4:71. doi: 10.3389/fmolb.2017.00071

35. GeneCards. (2023). *BAIAP2 Gene - BAR/IMD Domain Containing Adaptor Protein*  
2. Recuperado el 28 de febrero del 2023 de: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BAIAP2>
36. Giallourakis C, Cao Z, Green T, Wachtel H, Xie X, Lopez-Illasaca M, Daly M, Rioux J, Xavier R. A molecular-properties-based approach to understanding PDZ domain proteins and PDZ ligands. *Genome Res.* 2006 Aug;16(8):1056-72. doi: 10.1101/gr.5285206. Epub 2006 Jul 6. PMID: 16825666; PMCID: PMC1524865.
37. Gordon S, Philip T. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews.* 2005. 5. 953-964
38. Gough P and Myles IA (2020) Tumor Necrosis Factor Receptors: Pleiotropic Signaling Complexes and Their Differential Effects. *Front. Immunol.* 11:585880. doi: 10.3389/fimmu.2020.585880
39. Guo HJ, Tadi P. Biochemistry, Ubiquitination. [Updated 2022 Jan 24]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): *StatPearls Publishing*; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556052/>
40. Gutiérrez-González LH, Rivas-Fuentes S, Guzmán-Beltrán S, Flores-Flores A, Rosas-García J, Santos-Mendoza T. Peptide Targeting of PDZ-Dependent Interactions as Pharmacological Intervention in Immune-Related Diseases. *Molecules.* 2021 Oct 21;26(21):6367. doi: 10.3390/molecules26216367. PMID: 34770776; PMCID: PMC8588348.
41. Hart PD, Armstrong JA. Strain virulence and the lysosomal response in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1974 Oct;10(4):742-6. doi: 10.1128/iai.10.4.742-746.1974. PMID: 4214780; PMCID: PMC423015.
42. Heinrichs, Marc. and May, Robert. and Heider, Fabian. and Reimers, Tobias. and B. Sy, Sherwin. and Peloquin, Charles. and Derendorf, Hartmut. *Mycobacterium tuberculosis* Strains H37ra and H37rv have equivalent minimum inhibitory concentrations to most antituberculosis drugs. *International Journal of Mycobacteriology.* 2018. 7(2). 156-161. doi = 10.4103/ijmy.ijmy\_33\_18

43. Hirayama D, Iida T, Nakase H. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2017 Dec 29;19(1):92. doi: 10.3390/ijms19010092. PMID: 29286292; PMCID: PMC5796042.
44. Hossain MM, Norazmi MN. Pattern recognition receptors and cytokines in Mycobacterium tuberculosis infection--the double-edged sword? *Biomed Res Int*. 2013; 2013:179174. doi: 10.1155/2013/179174. Epub 2013 Nov 12. PMID: 24350246; PMCID: PMC3844256.
45. Hung AY, Sheng M. PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem*. 2002 Feb 22;277(8):5699-702. doi: 10.1074/jbc.R100065200. Epub 2001 Dec 10. PMID: 11741967.
46. Ito Toshihiro, Connett Judith, Kunkel Steven, Matsukawa Akihiro. The linkage of innate and adaptive immune response during granulomatous development. *Frontiers in Immunology*. 2013. 4. DOI=10.3389/fimmu.2013.00010
47. Jehl, P. Jean Manguy, Denis C. Shields, Desmond G. Higgins, and Norman E. Davey. *Nucl. Acids Res*. April 16, 2016 doi:10.1093/nar/gkw265
48. Jo K, Derin R, Li M, Bretz DS. Characterization of MALS/Velis-1, -2, and -3: a family of mammalian LIN-7 homologs enriched at brain synapses in association with the postsynaptic density-95/NMDA receptor postsynaptic complex. *J Neurosci*. 1999 Jun 1;19(11):4189-99. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-11-04189.1999. PMID: 10341223; PMCID: PMC6782594.
49. Joffre, O., Segura, E., Savina, A. et al. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 12, 557–569 (2012). <https://doi.org/10.1038/nri3254>
50. Katja L. Sebastian C. Gilles T. The emerging contribution of sequence context of the specificity of protein interactions mediated by PDZ domains. *FEBS Letters*. 2012. 586: 2648-2661. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.03.056>.
51. Kaneko, N., Kurata, M., Yamamoto, T. et al. The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflamm Regener* 39, 12 (2019). <https://doi.org/10.1186/s41232-019-0101-5>

52. Landry Blanc and Martine Gilleron and Jacques Prandi and Ok-ryul Song and Mi-Seon Jang and Brigitte Gicquel and Daniel Drocourt and Olivier Neyrolles and Priscille Brodin and Gérard Tiraby and Alain Vercellone and Jérôme Nigou. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits human innate immune responses via the production of TLR2 antagonist glycolipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017. 114(42). 11205-11210. doi= 10.1073/pnas.1707840114
53. Lee and Zheng, PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification *Cell Communication and Signaling* 2010, 8:8
54. Li, D., Wu, M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Sig Transduct Target Ther* 6, 291 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00687-0>
55. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. et al. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Sig Transduct Target Ther* 2, 17023 (2017). <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
56. López, J. (2015). *Análisis de la localización subcelular de proteínas con dominios PDZ en células presentadoras de antígeno*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México
57. Lozovatsky L, Abayasekara N, Piawah S, Walther Z. CASK deletion in intestinal epithelia causes mislocalization of LIN7C and the DLG1/Scrib polarity complex without affecting cell polarity. *Mol Biol Cell*. 2009 Nov;20(21):4489-99. doi: 10.1091/mbc.e09-04-0280. Epub 2009 Sep 2. PMID: 19726564; PMCID: PMC2770937.
58. Ludford-Menting MJ, Oliaro J, Sacirbegovic F, Cheah ET, Pedersen N, Thomas SJ, Pasam A, Iazzolino R, Dow LE, Waterhouse NJ, Murphy A, Ellis S, Smyth MJ, Kershaw MH, Darcy PK, Humbert PO, Russell SM. A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation. *Immunity*. 2005 Jun;22(6):737-48. doi: 10.1016/j.immuni.2005.04.009. PMID: 15963788.
59. Lurier EB, Dalton D, Dampier W, Raman P, Nassiri S, Ferraro NM, Rajagopalan R, Sarmady M, Spiller KL. Transcriptome analysis of IL-10-stimulated (M2c) macrophages by next-generation sequencing. *Immunobiology*. 2017 Jul;222(7):847-856. doi: 10.1016/j.imbio.2017.02.006. Epub 2017 Feb 20. PMID: 28318799; PMCID: PMC5719494.

60. Manjunath, G.P., Ramanujam, P.L. & Galande, S. Structure function relations in PDZ-domain-containing proteins: Implications for protein networks in cellular signalling. *J Biosci* 43, 155–171 (2018). <https://doi.org/10.1007/s12038-017-9727-0>
61. Martin-Gayo Enrique, Yu Xu G. Role of Dendritic Cells in Natural Immune Control of HIV-1 Infection. *Frontiers in Immunology*. 2019. 10. DOI=10.3389/fimmu.2019.01306. ISSN=1664-3224
62. Masters TA, Pontes B, Viasnoff V, Li Y, Gauthier NC. Plasma membrane tension orchestrates membrane trafficking, cytoskeletal remodeling, and biochemical signaling during phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jul 16;110(29):11875-80. doi: 10.1073/pnas.1301766110. Epub 2013 Jul 2. PMID: 23821745; PMCID: PMC3718161.
63. Matsumoto A, Mizuno M, Hamada N, Nozaki Y, Jimbo EF, Momoi MY, et al. (2014) LIN7A Depletion Disrupts Cerebral Cortex Development, Contributing to Intellectual Disability in 12q21-Deletion Syndrome. *PLoS ONE* 9(3): e92695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092695>
64. Mayer-Barber, K. D., & Barber, D. L. (2015). Innate and Adaptive Cellular Immune Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, a018424. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018424>
65. Maxson Michelle Sergio Grinstein; The vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase at a glance—more than a proton pump. *J Cell Sci* 1 December 2014; 127 (23): 4987–4993. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.158550>
66. Mellman I. Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunol Res*. 2013 Sep;1(3):145-9. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0102. PMID: 24777676.
67. Min Kyung Kim. Jaeyun Kim. Properties of immature and mature dendritic cells: phenotype, morphology, phagocytosis, and migration. *Royal Society of Chemistry*. 2019. 9. 11230-11238. DOI: 10.1039/C9RA00818G
68. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008 Dec;8(12):958-69. doi: 10.1038/nri2448. Erratum in: *Nat Rev Immunol*. 2010 Jun;10(6):460. PMID: 19029990; PMCID: PMC2724991.

69. Muntjewerff Elke M., Meesters Luca D., van den Bogaart Geert. Antigen Cross-Presentation by Macrophages. *Frontiers in Immunology*. 2020. 11. DOI=10.3389/fimmu.2020.01276. ISSN=1664-3224
70. NIH; (2023); *LIN7A lin-7 homolog A, crumbs cell polarity complex component [ Homo sapiens (human) ]* recuperado el 23 de marzo del 2023 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8825#:~:text=LIN7A%20is%20a%20PDZ%20protein,of%20DLG1%20to%20cell%20junctions>.
71. Nourry C, Grant SG, Borg JP. PDZ domain proteins: plug and play! *Sci STKE*. 2003 Apr 22;2003(179):RE7. doi: 10.1126/stke.2003.179.re7. PMID: 12709532.
72. Olsen, O. et. al. (2004). Differential localization of mammalian Lin-7 (MALS/Veli) PDZ proteins in the kidney. *American Journal of Physiology –Renal Physiology*. 288: F345 – F352. doi:10.1152/ajprenal.00235.2004.
73. Patente Thiago A., Pinho Mariana P. Oliviera Aline a., Evangelista Gabriela C. M., Bergami-Santos Patrícia C., Barbuto José A. M.; Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy; *Frontiers in Immunology*. 2019. 9. DOI=10.3389/fimmu.2018.03176
74. Jin, P., Han, T.H., Ren, J. et al. Molecular signatures of maturing dendritic cells: implications for testing the quality of dendritic cell therapies. *J Transl Med* 8, 4 (2010). <https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-4>
75. Pieters, J. Mycobacterium tuberculosis and the Macrophage: Maintaining a Balance. *Cell Host & Microbe*. 2008. 3(6). <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.05.006>.
76. Re, F & Strominger, J. Toll-like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 Differentially Activate Human Dendritic Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2001. 276(40). 37692-37699. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M105927200>
77. Romero G, von Zastrow M, Friedman PA. Role of PDZ proteins in regulating trafficking, signaling, and function of GPCRs: means, motif, and opportunity. *Adv Pharmacol*. 2011;62:279-314. doi: 10.1016/B978-0-12-385952-5.00003-8. PMID: 21907913; PMCID: PMC4968410.

78. Rosas-García J, Ramón-Luing LA, Bobadilla K, Meraz-Ríos MA, Sevilla-Reyes EE, Santos-Mendoza T. Distinct Transcriptional Profile of PDZ Genes after Activation of Human Macrophages and Dendritic Cells. *Int J Mol Sci.* 2022 Jun 24;23(13):7010. doi: 10.3390/ijms23137010. PMID: 35806015; PMCID: PMC9266728.
79. Ross EA, Devitt A and Johnson JR (2021) Macrophages: The Good, the Bad, and the Gluttony. *Front. Immunol.* 12:708186. doi: 10.3389/fimmu.2021.708186
80. Sakarya, E. (2021). Characterization of a PDZ domain-containing protein in macrophages. McMaster University
81. Sanna B, Kramer D, Genazzani AA. The expression of the PDZ protein MAL-1/velis is regulated by calcium and calcineurin in cerebellar granule cells. *J Biol Chem.* 2002 Dec 20;277(51):49585-90. doi: 10.1074/jbc.M207826200. Epub 2002 Oct 21. PMID: 12393911.
82. Satpathy, A., Wu, X., Albring, J. et al. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 13, 1145–1154 (2012). <https://doi.org/10.1038/ni.2467>
83. Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev.* 2007 Oct;219:143-56. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x. PMID: 17850487.
84. Schlesinger. L.S. Entry of *Mycobacterium tuberculosis* into Mononuclear Phagocytes. *T. M. Shinnick.* 1996
85. Seonok Lee and Shuling Fan and Olya Makarova and Samuel Straight and Ben Margolis, A Novel and Conserved Protein-Protein Interaction Domain of Mammalian Lin-2/CASK Binds and Recruits SAP97 to the Lateral Surface of Epithelia, *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 22(6), 1778-1791, doi =10.1128/MCB.22.6.1778-1791.2002},
86. Shaeib F, Khan SN, Thakur M, Kohan-Ghadr HR, Drewlo S, Saed GM, Pennathur S, Abu-Soud HM. The Impact of Myeloperoxidase and Activated Macrophages on Metaphase II Mouse Oocyte Quality. *PLoS One.* 2016 Mar 16;11(3):e0151160. doi: 10.1371/journal.pone.0151160. PMID: 26982351; PMCID: PMC4794194.

87. Shelly M, Mosesson Y, Citri A, Lavi S, Zwang Y, Melamed-Book N, Aroeti B, Yarden Y. Polar expression of ErbB-2/HER2 in epithelia. Bimodal regulation by Lin-7. *Dev Cell*. 2003 Sep;5(3):475-86. doi: 10.1016/j.devcel.2003.08.001. PMID: 12967566.
88. Sheng, M, Sala, C. PDZ Domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001. 24:1–29 <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.1>
89. Shrimpton RE, Butler M, Morel AS, Eren E, Hue SS, Ritter MA. CD205 (DEC-205): a recognition receptor for apoptotic and necrotic self. *Mol Immunol*. 2009 Mar;46(6):1229-39. doi: 10.1016/j.molimm.2008.11.016. Epub 2009 Jan 8. PMID: 19135256; PMCID: PMC2680960.
90. Sia, J. K., & Rengarajan, J. (2019). Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* Infections. *Microbiology Spectrum*, 7(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0022-2018>
91. Stefan Butz. Masaya Okamoto. Thomas C Südhof. A Tripartite Protein Complex with the Potential to Couple Synaptic Vesicle Exocytosis to Cell Adhesion in Brain. *Cell Press*. 1998. 94(6): 773-782. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81736-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81736-5)
92. Sven Huelsmann, Christina Hepper, Daniele Marchese, Christian Knöll, Rolf Reuter; The PDZ-GEF Dizzy regulates cell shape of migrating macrophages via Rap1 and integrins in the *Drosophila* embryo. *Development* 1 August 2006; 133 (15): 2915–2924. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.02449>
93. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:901-44. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816. PMID: 15771589.
94. THE HUMAN PROTEIN ATLAS. (s.f.); *CASK*; recuperado el 28 de febrero del 2022 de: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000147044-CASK/immune+cell>
95. THE HUMAN PROTEIN ATLAS. (s.f.); *EPB41*; recuperado el 28 de febrero del 2022 de: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000159023-EPB41/immune+cell>

96. Trask OJ Jr. Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B) Translocation Assay Development and Validation for High Content Screening. 2012 Oct 1. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK100914/>
97. Uniprot; (2022); *UniProtKB - O14910 (LIN7A\_HUMAN)*; recuperado el 05 de marzo de 2022 de: <https://www.uniprot.org/uniprot/O14910>
98. Uribe-Querol E and Rosales C (2020) Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Front. Immunol.* 2020. 11:1066. doi: 10.3389/fimmu.2020.01066
99. Wang, YC., Peterson, S. & Loring, J. Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell Res* 24, 143–160 (2014). <https://doi.org/10.1038/cr.2013.151>
100. Weisheit, C., Engel, D., Kurts, C. Dendritic Cells and Macrophages Sentinels in the Kidney. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology.* 10(10). 1841-1851- 2015. DOI: 10.2215/CJN.07100714
101. Wilson N, Villadango J. Regulation of Antigen Presentation and Cross-Presentation in the Dendritic Cell Network: Facts, Hypothesis, and Immunological Implications. *Advances in Immunology.* 2005. 86:241-305
102. Yan Y, Chen R, Wang X, Hu K, Huang L, Lu M and Hu Q (2019) CCL19 and CCR7 Expression, Signaling Pathways, and Adjuvant Functions in Viral Infection and Prevention. *Front. Cell Dev. Biol.* 7:212. doi: 10.3389/fcell.2019.00212
103. Yao Y, Xu XH, Jin L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front Immunol.* 2019 Apr 15;10:792. doi: 10.3389/fimmu.2019.00792. PMID: 31037072; PMCID: PMC6476302.
104. Yesudhas, Dhanusha & Gosu, Vijayakumar & Anwar, Ayaz & Choi, Sangdun. (2014). Multiple Roles of Toll-Like Receptor 4 in Colorectal Cancer. *Frontiers in immunology.* 5. 334. 10.3389/fimmu.2014.00334.

105. Yutaka Hata, Hiroyuki Nakanishi, Yoshimi Takai. Synaptic PDZ domain-containing proteins. *Neuroscience Research*. 1998. 32(1). 1-7. ISSN 0168-0102. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(98\)00069-8](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(98)00069-8).
106. Zhang Chunye, Yang Ming, Ericsson Aaron C. Function of Macrophages in Disease: Current Understanding on Molecular Mechanisms. *Frontiers in Immunology*. 2021. 12. DOI=10.3389/fimmu.2021.620510. ISSN=1664-3224
107. Zheng H, Lu L, Wang B, Pu S, Zhang X, et al. (2008) Genetic Basis of Virulence Attenuation Revealed by Comparative Genomic Analysis of Mycobacterium tuberculosis Strain H37Ra versus H37Rv. *PLOS ONE* 3(6): e2375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002375>
108. Zheng, W., Umitsu, M., Jagan, I. et al. An interaction between Scribble and the NADPH oxidase complex controls M1 macrophage polarization and function. *Nat Cell Biol* 18, 1244–1252 (2016). <https://doi.org/10.1038/ncb3413>

## 12. Anexo I | Disoluciones

### **PBS 1X (1L)**

- NaCl: 137 mM (8.0 g)
- KCl: 2.7 mM (0.2 g)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 10 mM (1.4 g)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1.8 mM (0.24 g)
- Ajustar a pH 7.4

### **Disolución de lisis de eritrocitos (1 L)**

- NH<sub>4</sub>Cl: 150 mM (8.023 g)
- NaHCO<sub>3</sub>: 10 mM (0.84 g)
- EDTA: 0.1 mM (0.029 g)

### **Disolución de Miltenyi (200 mL)**

- EDTA: 2 mM (0.117 g)
- SFB: 0.5% (1 mL)
- PBS 1X cbp 200 mL

### **Medio RPMI completo (50 mL)**

- SFB: 10% (5 mL)
- Glutamina 200 mM: 2mM (500 µL)
- Estreptomicina 10 000 µg/mL | Penicilina 10 000 U/mL: 100 µg/mL | 100 U/mL (500 µL)
- Medio RPMI: cuanto baste para (cpb) 50 mL (44 mL)

### **Disolución de carga 6X (25 mL)**

- Clorhidrato de Tris: 0.375 M (1.14 g)
- Glicerol: 50% (12.5 mL)
- Azul de Bromofenol: 0.03% (0.0075 g)
- SDS: 9% (2.25 g)
- $\beta$ -mercaptoetanol: 9.9% (2.47 mL)
- Ajustar a pH 6.8

### **Gel de poliacrilamida al 12% (separador) (10 mL)**

- Agua destilada: 3.3 mL
- Clorhidrato de Tris 1.5 M pH 8.8: 2.5 mL
- Acrilamida 30%: 4.0 mL
- SDS 10%: 0.1 mL
- Persulfato de amonio: 0.1 mL
- TEMED: 4  $\mu$ L

### **Gel de poliacrilamida al 5% (concentrador) (5 mL)**

- Agua destilada: 3.4 mL
- Clorhidrato de Tris 0.5 M pH 6.8: 0.63 mL
- Acrilamida 30%: 0.83 mL
- SDS 10%: 0.05 mL
- PSA: 0.05 mL
- TEMED: 5  $\mu$ L

### **Disolución de electroforesis 1X (1L)**

- Tris base: 25 mM (3.0285 g)
- Glicina: 200 mM (15.014 g)
- SDS: 0.1% (1 g)
- Ajustar a pH 8.3

### **Disolución de transferencia 1X (1L)**

- Tris base: 25 mM (3.0285 g)
- Glicina: 200 mM (15.014 g)
- MeOH: 20% (200 mL)

### **TBS 1X (1 L)**

- Tris base: 20 mM (2.4 g)
- NaCl: 150 mM (8.8 g)
- Ajustar a pH 7.6

### **Disolución de lavado para WB (TBS-T) (1L)**

- Tris base: 20 mM (2.4 g)
- NaCl: 150 mM (8.8 g)
- Tween 20: 0.1% (1 mL)
- Ajustar a pH 7.6

### **Disolución de lavado para IF (200 mL)**

- BSA: 1% (2 g)
- Tritón X-100: 0.1% (100  $\mu$ L)
- PBS 1X cbp 200 mL

### 13. Anexo II | Reactivos utilizados para las disoluciones

- Albúmina sérica bovina: Calbiochem, EE. UU., REF 126593
- Azul de bromofenol: Sigma, EE. UU., REF B6896
- Clorhidrato de Tris: Biobasic, Canadá, REF TB0103
- Disolución 30% Acrilamida/Bis: BioRad, EE. UU., REF 1610158
- Dodecil sulfato de sodio: Calbiochem, EE. UU., REF 428015
- EDTA: Gibco BRL, EE. UU., REF 15576
- Estreptomina 10 000 µg/mL | Penicilina 10 000 U/mL: Gibco, EE. UU., REF 15140-122
- Glicerol: Gibco BRT, EE. UU., REF 15514011
- Glicina: BioRad, EE. UU., REF 1610718
- Glutamina 200 mM: Gibco, EE. UU., REF 02546
- KCl: Meyer, México, REF 2015
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: J.T. Baker, EE. UU., REF 3246-01
- Medio RPMI: Corning, EE. UU., REF 15-040-CV
- MeOH: Hycel, México, REF 912
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Meyer, México, REF 2405
- NaCl: J. T. Baker, EE. UU., REF 3625-05
- NaHCO<sub>3</sub>: Sigma, EE. UU., REF S-4019
- NH<sub>4</sub>Cl: J. T. Baker, EE. UU., REF 0660-01
- Persulfato de amonio: Sigma, EE. UU., REF A9164
- SFB: Cytiva, EE. UU., REF 10703464
- TEMED: BioRad, EE. UU., REF 1610801
- Tris base: Sigma-Aldrich, EE. UU., REF T1503
- Tritón X-100: donación
- Tween 20: Sigma, EE. UU., REF P2287
- β-mercaptoetanol: Calbiochem, EE. UU., REF 200-464-6