



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PATJ EN CÉLULAS  
PRESENTADORAS DE ANTÍGENO

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

**BRENDA ALEJANDRA ZÁMANO MARTÍNEZ**

CDMX      2023





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** Profesor: MORENO EUTIMIO MARIO ADÁN  
**VOCAL:** Profesor: CASTRO ESCAMILLA OCTAVIO  
**SECRETARIO:** Profesor: SANTOS MENDOZA MARÍA TERESA  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: PEDROZA GARCÍA JOSÉ ANTONIO  
**2° SUPLENTE:** Profesor: FLORES MEJÍA LUIS ÁNGEL

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

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

**ASESOR DEL TEMA**

Dra. María Teresa Santos Mendoza



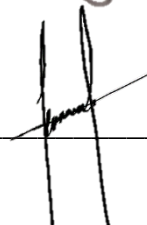
**SUPERVISOR TÉCNICO:**

Dr. Jorge Rosas García



**SUSTENTANTE:**

Brenda Alejandra Zámano Martínez



## ÍNDICE

<b>1. ÍNDICE</b>	<b>III</b>
<b>2. Abreviaturas y acrónimos</b>	<b>V</b>
<b>3. Resumen</b>	<b>1</b>
<b>4. Introducción</b>	<b>2</b>
<b>4.1. Proteínas PDZ</b>	<b>4</b>
<b>4.1.1. Familias</b>	<b>4</b>
<b>4.1.2. Estructura</b>	<b>5</b>
<b>4.1.3. Funciones</b>	<b>7</b>
<b>4.2. PATJ (del inglés, protein associated tight junctions)</b>	<b>8</b>
<b>4.3. El sistema inmunológico</b>	<b>12</b>
<b>4.3.1. CPA profesionales: macrófagos y células dendríticas</b>	<b>13</b>
<b>4.3.1.1. Características y función de los macrófagos</b>	<b>13</b>
<b>4.3.1.2. Características y función de las células dendríticas</b>	<b>13</b>
<b>4.3.2. Receptores de reconocimiento de patrones (PRR)</b>	<b>14</b>
<b>5. Justificación</b>	<b>17</b>
<b>6. Hipótesis</b>	<b>18</b>
<b>7. Objetivos</b>	<b>18</b>
<b>7.1. Objetivo general</b>	<b>18</b>
<b>7.2. Objetivos particulares</b>	<b>18</b>
<b>8. Metodología</b>	<b>19</b>
<b>8.1. Obtención de PBMC</b>	<b>19</b>
<b>8.2. Purificación de monocitos (Mo) CD14+ por selección positiva</b>	<b>19</b>
<b>8.3. Diferenciación de monocitos CD14+ a macrófagos</b>	<b>20</b>
<b>8.4. Diferenciación de monocitos CD14+ a células dendríticas</b>	<b>21</b>
<b>8.5. Análisis de la expresión subcelular de PATJ por inmunofluorescencia (IF)</b>	<b>22</b>
<b>8.6. Análisis de la expresión de PATJ por Western Blot (WB)</b>	<b>22</b>
<b>8.6.1. Lisis celular</b>	<b>22</b>
<b>8.6.2. Cuantificación de proteína</b>	<b>23</b>
<b>8.6.3. SDS-PAGE</b>	<b>23</b>

8.6.4. Western Blot	23
9. Resultados	25
9.1. Titulación de anticuerpos en MA y DC	25
9.2. Localización intracelular de PATJ en MA basal y en respuesta a ligando de PRR	26
9.3. Localización intracelular de PATJ en DC basal y en respuesta a ligando de PRR	30
9.4. Análisis de los cambios de expresión de PATJ en MA y DC mediante WB	35
10. Discusión	43
11. Conclusiones	50
12. Perspectivas	50
13. Apéndice I: Disoluciones	51
14. Bibliografía	53

## 2. Abreviaturas y acrónimos

Ac: Anticuerpo

Ag: Antígeno

aPKC: Proteína cinasa C atípica

BSA: Albúmina sérica bovina

CCR7: Receptor de quimiocinas CCL19 y CCL21

CPA: Célula presentadora de antígeno

DAMP: Patrones moleculares asociados a daño

DC: Células dendríticas

Dlg: Del inglés "Disc large"

G: Gravedades

Guk: Guanilato cinasa

GRIP: Proteína que actúa con el receptor de glutamato

h: Horas

HKMTb: *Mycobacterium tuberculosis* muerta por calor

HRP: Peroxidasa de rábano picante

iDC: Células dendríticas inmaduras

IF: Inmunofluorescencia

iNOS: Óxido nítrico sintasa

LIM: Lin-11, Isl-1 y Mec-3

LRR: Repetidos ricos en leucina

MA: Macrófagos

MAGUK: Guanilato cinasas asociadas a membrana

mDC: Células dendríticas maduras

MC: Coctel de maduración

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad

min: Minutos

Mo: Monocitos

MOI: Multiplicidad de infección  
mRNA: Ácido ribonucleico mensajero  
Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*  
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
NF-κB: Factor nuclear κB  
NHERF1: Factor regulador del intercambiador NA<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>  
PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos  
PATJ: Del inglés “Protein associated tight junctions”  
PBMC: Células mononucleares de sangre periférica  
PBS: Solución salina amortiguadora de fosfatos  
PDZ: Acrónimo de PSD-95, Dlg y ZO-1  
PDZbm: Motivo de unión a PDZ  
PRR: Receptor de reconocimiento de patrones  
PSD-95: Del inglés “Post-synaptic density 95”  
PVDF: Polifluoruro de vinilideno  
ROS: Especies reactivas de oxígeno  
rpm: Revoluciones por minuto  
SFB: Suero fetal bovino  
SH3: Del inglés “SRC homology 3”  
SI: Sinapsis inmunológica  
TA: Temperatura ambiente  
TBS: Disolución salina tamponada con TRIS  
TLR: Receptores tipo “toll”  
V: Volts  
WB: Western blot  
WW: Repetidos de WWP  
ZO: Del inglés “Zonula ocludens”

### **3. Resumen**

Las proteínas con función de andamiaje, como las proteínas PDZ (PSD-95, Dlg-1 y ZO-1) son muy importantes para el mantenimiento de la homeostasis celular ya que participan en múltiples funciones como el mantenimiento de la polaridad celular, migración, tráfico de proteínas, transducción de señales, etc. Estas proteínas están ampliamente conservadas evolutivamente y han sido estudiadas mayormente en células epiteliales y neuronas, pero muy poco en células del sistema inmunológico. Recientemente nuestro grupo de estudio encontró que varios genes de proteínas PDZ se expresan de manera basal en las células presentadoras de antígenos profesionales como los macrófagos (MA) y células dendríticas (DC), y que cambian su expresión en respuesta a ligandos de receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Entre estos genes se encontró el gen codificante de PATJ (del inglés “protein associated tight junctions”). El objetivo de este estudio fue analizar la expresión de la proteína PATJ en MA y DC al estimular estas células a través de diferentes PRR, mediante los métodos de inmunofluorescencia y western blot. Se encontró que al estimular a través de diversos PRR hay una tendencia de aumento en la expresión de PATJ y, específicamente al estimular TLR (receptores tipo “toll”) como el 2, 4 y 9, hay un aumento significativo. Se observó también un patrón de localización diferente de PATJ en ambas células; en MA se observa mayormente en lo que parece ser la membrana plasmática y concentrado en zonas específicas del núcleo, mientras que en las DC se encuentra principalmente en citoplasma. Además, se observan cambios en la localización subcelular ante el estímulo de diversos PRR como CR3 y TLR con una mayor concentración de la proteína en el núcleo en ambas células. Estos resultados sugieren que PATJ es importante en los mecanismos de señalización de MA y DC para responder ante la estimulación de diversos PRR. Se requieren más estudios para descubrir las interacciones de PATJ y conocer su función en MA y DC.



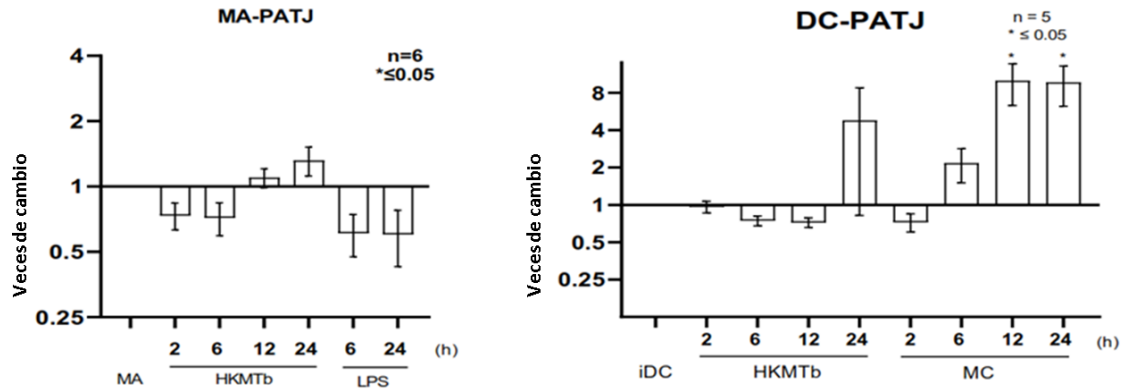
#### 4. Introducción

Un adecuado desempeño de la célula depende mucho del buen funcionamiento de sus proteínas, muchos de los procesos celulares dependen de interacciones proteína-proteína que se basan en dominios con reconocimiento específico. Estos dominios se unen a moléculas o proteínas que pueden ubicarse en diferentes complejos formando redes multifuncionales. Dentro de los dominios de interacción, los dominios PDZ (PSD-95, Dlg-1 y ZO-1) son de los más abundantes en el proteoma humano y están ampliamente conservados en la naturaleza (Gardiol D., 2012).

Las interacciones PDZ-dependientes son tan importantes para mantener la homeostasis del organismo que una alteración en ellas puede conducir a enfermedades, tales como trastornos neurológicos, cáncer, fibrosis quística, pérdida de audición y trastornos de la visión, trastornos metabólicos, afecciones renales y cardíacas, etc. (Liu X. & Fuentes E 2019, Christensen N., *et. al.*, 2019). También se sabe que algunos agentes patógenos, mediante un mecanismo de mimetismo molecular, usurpan las interacciones PDZ-dependientes endógenas de las células para favorecer su supervivencia y, por ende, la diseminación de la enfermedad. (Caillet Saguy C., *et.al.*, 2015).

Las proteínas PDZ han sido mayormente estudiadas en células epiteliales y neuronales, sin embargo, se sabe poco de su función en células del sistema inmunológico. De acuerdo a los resultados obtenidos recientemente en el laboratorio de Transcriptómica e Inmunología Molecular, el estudio del perfil transcripcional de 84 genes PDZ en macrófagos (MA) y células dendríticas (DC), en diferentes condiciones de estimulación, encontró que más de 40 de ellos mostraron cambios en su expresión (Rosas García J., *et.al.*, 2022). PATJ fue uno de los genes que mostró diferencias significativas en DC a nivel de mRNA, por lo que es probable que a nivel de proteína también se observe un cambio. A pesar de que PATJ no mostró cambios significativos con todos los estímulos en ambos tipos celulares, se puede observar que hay una tendencia de disminución en MA y una tendencia de aumento en DC, con un cambio estadísticamente significativo con el estímulo

proinflamatorio (cóctel de maduración) (**Figura 1**). Por lo cual, sería interesante analizar lo que pasa con PATJ a nivel proteína en este tipo de células, ante diversos estímulos.



**Figura 1. Cambios de expresión en PATJ en MA y DC humanas.**

Gráficos del mRNA de PATJ en MA (izquierda) estimulados con *Mycobacterium tuberculosis* muerta por calor (HKMTb) y LPS; y DC (derecha) estimulados con *Mycobacterium tuberculosis* muerta por calor y coctel de maduración (MC). (Rosas García J., *et.al.*, 2022, resultados no publicados)

## 4.1 Proteínas PDZ

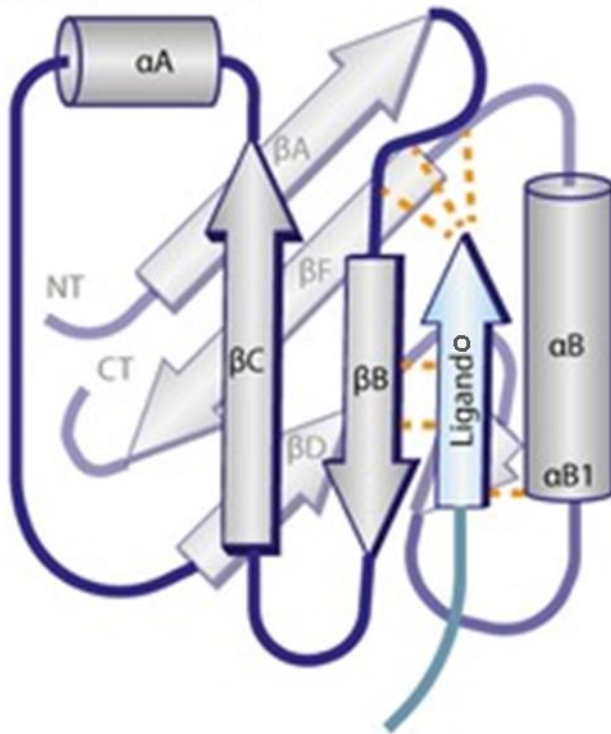
Las proteínas PDZ (acrónimo proveniente de las primeras proteínas en donde fueron encontrados: Post-synaptic density 95 (PSD-95), discs large (Dlg) y Zonula occludens (ZO-1)) son proteínas de andamiaje que participan en una amplia variedad de funciones celulares relacionadas con la polarización, migración, interacciones célula-célula, el tráfico y ensamblaje de proteínas, reconocimiento de células inmunitarias, sinapsis neuronales e inmunológicas, entre otras, de ahí su importancia y conservación en diversos organismos (Gardiol D., 2012).

### 4.1.1 Familias

De acuerdo con su organización modular, las proteínas PDZ se clasifican en tres familias: en la primera se encuentran las proteínas que contienen únicamente dominios PDZ, que comprenden desde uno a más de 10 de ellos, como sintenina-1 (proteína asociada a la diferenciación del melanoma) con dos dominios (Yu Y., *et.al.*, 2019), NHERF1 (factor regulador del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>) con dos dominios (Holcomb J., *et.al.*, 2015) o GRIP (proteína que interactúa con el receptor de glutamato) con 6 a 7 dominios (Long J., *et.al.*, 2008), entre otras. La segunda familia corresponde con las proteínas MAGUK (guanilato cinasas asociadas a la membrana) que cuentan con uno o tres dominios PDZ, un dominio SH3 (del inglés SRC homology 3) y un dominio tipo GuK (guanilato cinasa) sin actividad catalítica pero que se comporta como módulo de interacción proteína-proteína; en este grupo se encuentran la PSD-95, Dlg1 y ZO-1. En la tercera familia se encuentran las proteínas que contienen tanto dominios PDZ como otro tipo de dominios proteicos, como la anquirina, dominios LIM (Lin-11, Isl-1 y Mec-3), WW (repetidos de WWP), LRR (repetidos ricos en leucina), entre otros. Un ejemplo de ellas son la familia de proteínas LAP, en las que se encuentran erbina, scribble y densina, que tienen 16 dominios LRR y uno a cuatro dominios PDZ (Nourry C. *et.al.*, 2003, Barreda D., *et.al.*, 2020, Hata Y., *et.al.*, 1998) (**Figura 2**).



proteínas a las que se asocian, y son denominados motivos de unión a dominios PDZ (PDZbm) (Barreda D., *et.al.*,2020). La unión del péptido del ligando se lleva a cabo en una ranura formada por la lámina  $\beta$ -B y la hélice  $\alpha$ B del dominio PDZ (Nourry C. *et.al.*,2003, Christensen N., *et. al.*,2019) (**Figura 3**).



**Figura 3. Estructura canónica del dominio PDZ.**

Se muestra la disposición canónica de los dominios PDZ, las láminas  $\beta$  plegadas se representan en forma de flecha con sus respectivos caracteres; y las  $\alpha$ -hélices se representan en forma de cilindros con sus respectivos caracteres. El ligando se une entre la brecha formada entre la lámina  $\beta$ -B y la hélice  $\alpha$ B (Modificada de Christensen N., *et. al.*,2019)

Estos dominios PDZ se reconocieron por su capacidad de unión a secuencias peptídicas consenso. Su afinidad hacia estas secuencias está dictada por el propio aminoácido carboxilo terminal (nombrado P0,) y el aminoácido en posición -2 (P-2) (los aminoácidos siguientes hacia el amino terminal desde P0, se numeran -1,-2 y así sucesivamente). De esta manera se clasificaron los PDZbm en tres clases de acuerdo a su secuencia de aminoácidos (Nourry C. *et.al.*,2003, Manjunath G., *et.al.*,2017):

- Clase I: con secuencia consenso X-T/S -X- $\Psi$ , siendo T =Treonina; S=Serina, X=cualquier aminoácido y  $\Psi$ =aminoácido hidrofóbico
- Clase II: con secuencia consenso X- $\Psi$ -X- $\Psi$

- Clase III: con secuencia consenso X-D/E- X-Ψ, siendo D=Ácido aspártico; E=Ácido glutámico.

#### 4.1.3 Funciones

Los dominios PDZ están altamente conservados entre especies, su principal función es de andamiaje, reclutando receptores, componentes estructurales y moléculas de señalización formando complejos supramoleculares, dirigiéndolos a zonas o estructuras subcelulares específicas, interviniendo así, en múltiples procesos celulares (Nourry C. *et.al.*,2003). Participan en el ciclo celular, transducción de señales, tráfico de proteínas, migración, polaridad, metabolismo, comunicación célula-célula, respuesta celular a estímulos externos, replicación del DNA, transcripción, homeostasia, señalización, apoptosis, entre otras (Christensen N., *et. al.*,2019, Liu X. & Fuentes E 2019).

Para que una célula se desarrolle de manera correcta y pueda comunicarse eficazmente con sus células vecinas, el ordenamiento de sus proteínas y moléculas en espacio y tiempo deben ser correctos, y es tan fundamental, que un pequeño cambio en ellas puede amenazar la supervivencia celular (Manjunath G., *et.al.*,2017, Baruch Z. & Wendell A., 2001).

Las funciones de las proteínas PDZ han sido mayormente estudiadas en neuronas y células epiteliales, sin embargo, en los últimos años han sido analizadas en otro tipo de células, como en células del sistema inmunitario adaptativo. Por ejemplo, los linfocitos T (una de las células representativas de la inmunidad adaptativa) se activan cuando reconocen al antígeno a través de la formación de la sinapsis inmunológica (SI) (Estructura formada entre la unión de un linfocito T y una célula presentadora de antígeno). Se ha descubierto que en los linfocitos T también se expresa Scrib, la cual es una proteína del complejo SCRIBBLE, que contiene dominios PDZ y se polariza hacia el urópodo durante la migración de la célula al ganglio linfático. Durante el reconocimiento del antígeno se polariza hacia la SI, y es necesaria para la formación de la misma, ya que se ha visto que la regulación a la baja de esta proteína produce una disminución de las uniones linfocito T- CPA

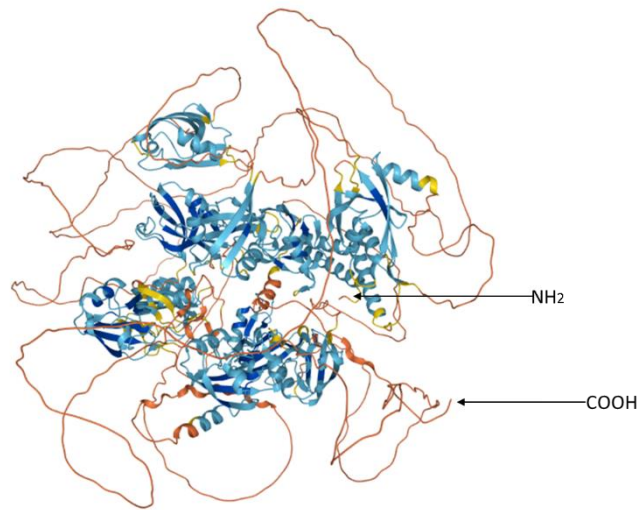
(célula presentadora de antígeno), comparada con las silvestres (Ludford M. *et.al.*, 2005, Barreda D., *et.al.*, 2020).

Recientemente, se encontró que Scrib también es fundamental en células del sistema inmunológico innato, ya que es necesario para la adecuada maduración de DC y, por lo tanto, para la correcta estimulación de linfocitos T (Barreda D., *et.al.*, 2020); además la unión del PDZ4 de Scrib con el PDZbm de la subunidad p22phox de la NADPH oxidasa es indispensable para la generación de ROS (especies reactivas de oxígeno), un mecanismo esencial de los MA para la eliminación de patógenos (Zheng, W. *et. al.* 2016).

#### **4.2 PATJ (del inglés, protein associated tight junctions)**

Un aspecto que llama la atención de los dominios PDZ es la frecuencia con la que aparecen varios dominios en un solo polipéptido. De las proteínas humanas que contienen estos dominios, el 18% contiene más de dos dominios PDZ (Baruch Z. & Wendell A., 2001), como la proteína PATJ (del inglés Protein associated tight junctions) con 10 de ellos, y otro dominio de interacción proteína-proteína de tipo L27.

También conocida en humanos como Cipp, INADL, hINADL, InaD-like, PATJ es una proteína de 1801 residuos de aminoácidos (Database Gncards) (**Figura 4**) que tiene 5 isoformas producidas por “splicing” alternativo, la primera con una masa molecular de 196.368 KDa (elegida como secuencia canónica) y las siguientes con 173.793, 170.238, 167.159, 125.231 KDa respectivamente (Uniprot). La expresión de la isoforma canónica de PATJ se ha encontrado mayormente en tejidos epiteliales humanos como vejiga, testículos, ovario, intestino delgado, colon, corazón, páncreas, riñón y pulmón, así como cerebro y músculo esquelético (Assemat E., *et.al.*, 2008).

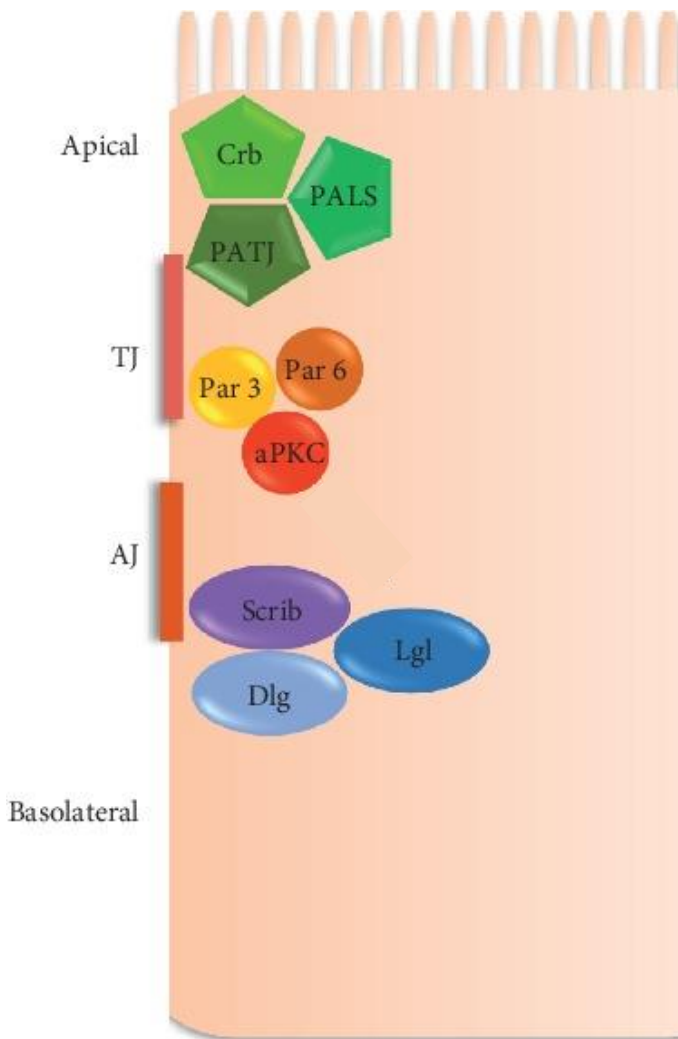


#### Figura 4. Estructura terciaria de PATJ

Estructura tridimensional de los 1801 aminoácidos de la proteína PATJ. Los extremos amino y carboxilo terminal de la proteína son indicados por flechas. Los colores indican la puntuación de confianza en la predicción de la estructura por aminoácido (confianza del modelo) siendo naranja: muy bajo, amarillo: bajo, azul cielo: seguro y azul rey: muy seguro. (Uniprot código Q8NI35).

PATJ participa durante el establecimiento de la polaridad celular, ya que permite la localización asimétrica de macromoléculas y orgánulos dentro de la célula. También permite el tráfico de vesículas y la dirección precisa de proteínas a zonas específicas en respuesta a señales extracelulares (Roh M., *et.al.*, 2002). La polaridad epitelial apico-basal está regida por proteínas de andamiaje que actúan normalmente en complejos y permiten la formación uniones celulares. Estos complejos son: el complejo SCRIBBLE con las proteínas Scrib, Dlg y Lgl en la zona base de la célula; el complejo PAR con las proteínas PAR3, PAR6 y aPKC en la parte superior de la célula; y el complejo CRUMBS con las proteínas hCRB, PALS1 y PATJ en la zona apical (Wang W., *et.al.*, 2021) (**Figura 5**).





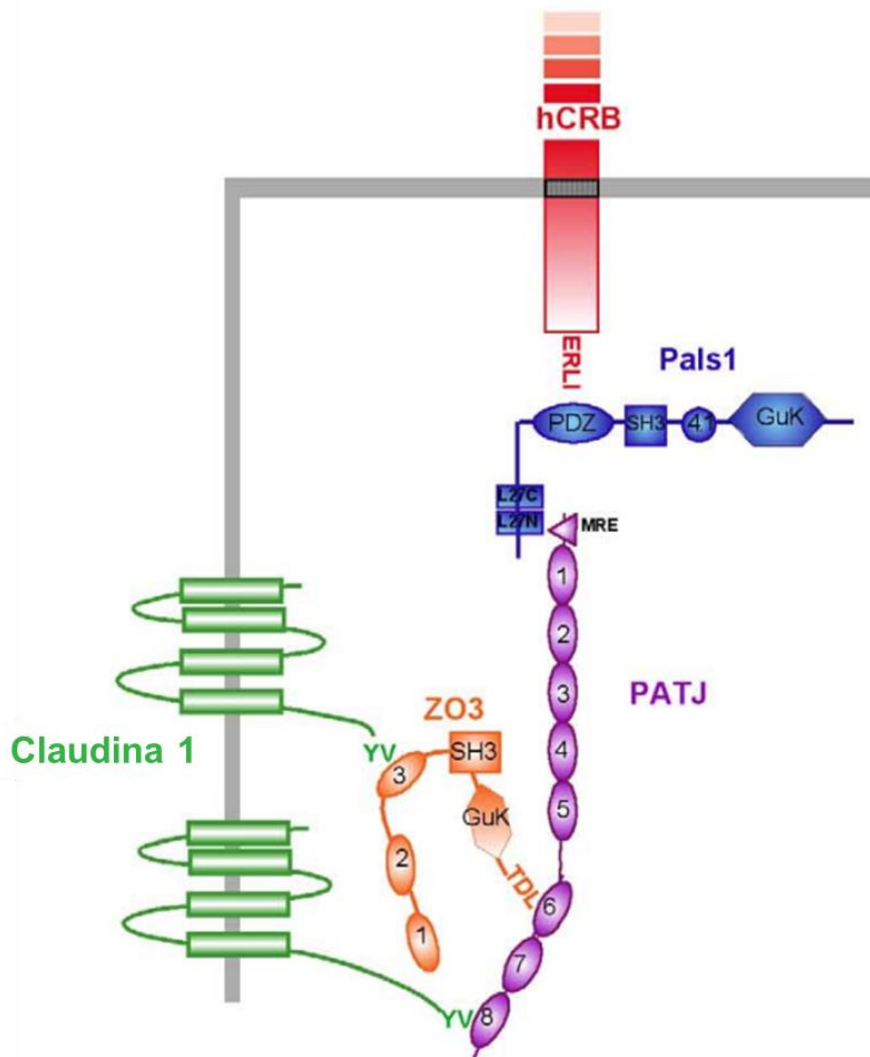
**Figura 5. Complejos de polaridad en células epiteliales**

En la zona apical de la célula el complejo CRUMBS, seguida del complejo PAR y el complejo SCRIBBLE en la zona basolateral (Modificado de Barreda D., 2020).

PATJ es un componente crucial del complejo Crumbs el cual participa en la formación de la polaridad celular y las uniones estrechas. Esta proteína se une al dominio L27 de PALS1 a través de su dominio L27 (dominio también llamado “Maguk recruitment:MRE”), y a su vez, PALS1 interactúa con los últimos cuatro residuos de aa (ERLI) citoplásmicos de hCRB, a través de su dominio PDZ en el lado apical de la célula. (Roh M., *et.al.*, 2002, Medina E., *et.al.*, 2002). A pesar de que PATJ no interactúa directamente con hCRB, la disminución de PATJ afecta su correcta distribución en la membrana apical al igual que la de PALS1 (Assemat E., *et.al.*, 2008).

El dominio PDZ6 de PATJ se une directamente al PDZbm de ZO-3 y el dominio PDZ8 interactúa directamente con el PDZbm de la Claudina-1. ZO-3 es una proteína

citoplásmica relacionada con las uniones estrechas por su unión con la Ocludina. La Ocludina y la Claudina-1 son proteínas transmembrana base para la formación de las uniones estrechas y se ha visto que la sobreexpresión o disminución de PATJ impide la correcta localización de ZO-3 y de la Ocludina (Rouaud, F., *et.al.*, 2020, Wells C., *et.al.*, 2006) (**Figura 6**).



**Figura 6. Uniones de PATJ**

Se muestran algunas de las interacciones de los dominios de la proteína PATJ. El dominio L27 (o MRE) de PATJ se une al dominio L27 de PALS1, el sexto dominio de PATJ se une al PDZbm de ZO-3, además de haber una interacción del octavo dominio de PATJ con el PDZbm de la Claudina-1 (Modificado de Médina E, 2002).

Además de ser importante para el mantenimiento de la polaridad celular, PATJ relaciona los componentes laterales (ZO-3 y Ocludina) y apicales (PALS1 y hCRB) de las uniones estrechas, estabiliza al complejo CRUMBS, participa en la migración celular y angiogénesis, y también está relacionado con la tumorigénesis y algunas infecciones virales (Wang W., *et.al.*, 2021).

Las interacciones PDZ dependientes están relacionadas con múltiples procesos celulares y son tan relevantes que suelen ser usurpadas por proteínas virales a través de mimetismo molecular (Gutiérrez L. & Santos M. 2019). El estudio de esta proteína PATJ, es de interés por su relación en varias vías celulares al formar parte del complejo CRUMBS, en donde se une a PALS1, blanco de la proteína E de SARS-CoV2 (Chai, J., *et.al.*, 2021). Además de que por sí misma, PATJ es blanco de la proteína E6 del virus del papiloma humano (Storrs, C. H., & Silverstein, S. J., 2007), por lo que sería interesante analizar la expresión de PATJ en otros tipos celulares y si se ve alterada con distintos estímulos aplicados.

### **4.3 El sistema inmunológico**

El sistema inmunológico es una compleja red de órganos, tejidos, células y componentes capaces de reaccionar ante sustancias o células del medio que reconocen como extrañas, fungiendo como un mecanismo de defensa para mantener la homeostasis e integridad del huésped (Abbas K., 2020, Sattler, S. 2017).

La respuesta inmunológica se genera tras el reconocimiento de los componentes extraños y se divide en dos de acuerdo a su velocidad y especificidad: la inmunidad innata (temprana pero inespecífica) y la adaptativa (tardía pero específica) (Parkin & Cohen, 2001). La respuesta inmunitaria innata es la primera línea de defensa con cuatro tipos de barreras: anatómicas (como piel y moco), fisiológicas (como temperatura y pH bajo), células fagocíticas e inflamación. La respuesta inmunitaria adaptativa consiste en reacciones específicas de linfocitos T y B que incorporan frecuentemente células y moléculas del sistema inmunitario innato contra los cuerpos extraños dañinos (Tomar & De, 2014)

### **4.3.1 CPA profesionales: macrófagos y células dendríticas**

Las células del sistema inmunitario innato se originan en la médula ósea, se distribuyen hacia sangre y tejidos, como aquellas que provienen de la estirpe mieloide, como las células dendríticas (DC) y macrófagos (MA). Estas células pertenecen a las células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales, que son células fagocíticas especializadas en la identificación, procesamiento y presentación de antígenos (Ag) para iniciar y regular las respuestas inmunitarias (Rosas García J., *et.al.*, 2022). Se caracterizan por tener una elevada expresión de moléculas MHC-II (complejo principal de histocompatibilidad tipo II) y ambas células son la conexión entre el sistema innato y adaptativo del sistema inmunitario.

#### **4.3.1.1 Características y función de los macrófagos**

Los macrófagos (MA) provienen de la diferenciación de los monocitos al llegar a diferentes tejidos, provenientes de sangre periférica, donde han recibido con un nombre diferente para asignar su ubicación específica. Su principal función es fagocitar y degradar agentes extraños, células muertas y desechos a través de la formación del fagolisosoma. Esto ocurre al acidificar el medio y generando especies reactivas de oxígeno (ROS) por la NADPH oxidasa, y óxido nítrico (NO) a través de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS). También se ha visto que son importantes en la regulación de los procesos inflamatorios (Varol C., *et. al.*, 2015, Shapouri-Moghaddam A., *et.al.*, 2018, Shamaei, M., & Mirsaiedi, M. 2021).

Al fagocitar cuerpos extraños y desintegrarlos, los macrófagos secretan citocinas al medio para atraer otras células inflamatorias al lugar, como los linfocitos T, que activan más macrófagos para terminar con el agente extraño. Además, también presentan Ag a través de moléculas MHC. (Shapouri-Moghaddam A., *et.al.*, 2018)

#### **4.3.1.2 Características y función de las células dendríticas**

Las células dendríticas (DC) tienen generalmente una morfología característica con múltiples prolongaciones llamadas pseudópodos o “dendritas” con propiedades fagocíticas y están presentes en órganos linfoides y no linfoides, así como en sangre periférica (Vázquez, M., *et.al.*,2012). Son poblaciones heterogéneas que se dividen

en células dendríticas plasmacitoides (pDC), células dendríticas mieloides convencionales (cDC1 y cDC2), y células dendríticas derivadas de monocitos (moDC). Las diferencias entre ellas se generan a partir de sus precursores celulares, proteínas y citocinas secretadas, lo que define su función en el sistema (Collin M., & Bigley V., 2018).

Las DC pasan por un proceso de maduración para ser activadas, las células precursoras son conocidas como células dendríticas inmaduras (iDC) que tienen como función principal la captura antigénica, interactúan con el exterior a través de las moléculas que expresan en su membrana celular, por procesos como la fagocitosis o endocitosis y responden a estas interacciones con la secreción de citocinas. (Clark, G. J., *et. al.*, 2019, Vázquez M., *et. al.*, 2012). Las iDC se diferencian a células dendríticas maduras (mDC) en respuesta al reconocimiento de un antígeno (Ag) a partir de un receptor de reconocimiento de patrones (PRR) o al recibir señales de “peligro” como la inflamación. Con la maduración adquieren motilidad, capacidad para presentar Ag proteicos y estimular linfocitos T, pero pierden su capacidad de captura antigénica (Corado J.2005, Sousa C. 2004).

Las DC tienen la capacidad de procesar Ag tanto endógenos como exógenos. Los Ag proteicos son degradados en péptidos cortos para ser presentados a los linfocitos T en las moléculas del MHC-I (si son Ag endógenos, a células T CD8+) o MHC-II (si son Ag exógenos, a TCD4+) para continuar así con la respuesta inmune adaptativa (Alfaro, C. *et.al.* 2013).

Las DC son parte esencial en la inducción y mantenimiento de la respuesta inmunológica, son importantes en la generación de tolerancia en condiciones homeostáticas y también desempeñan un papel patogénico importante en enfermedades como las autoinmunes y el cáncer (Zanna M., *et.al.*, 2021).

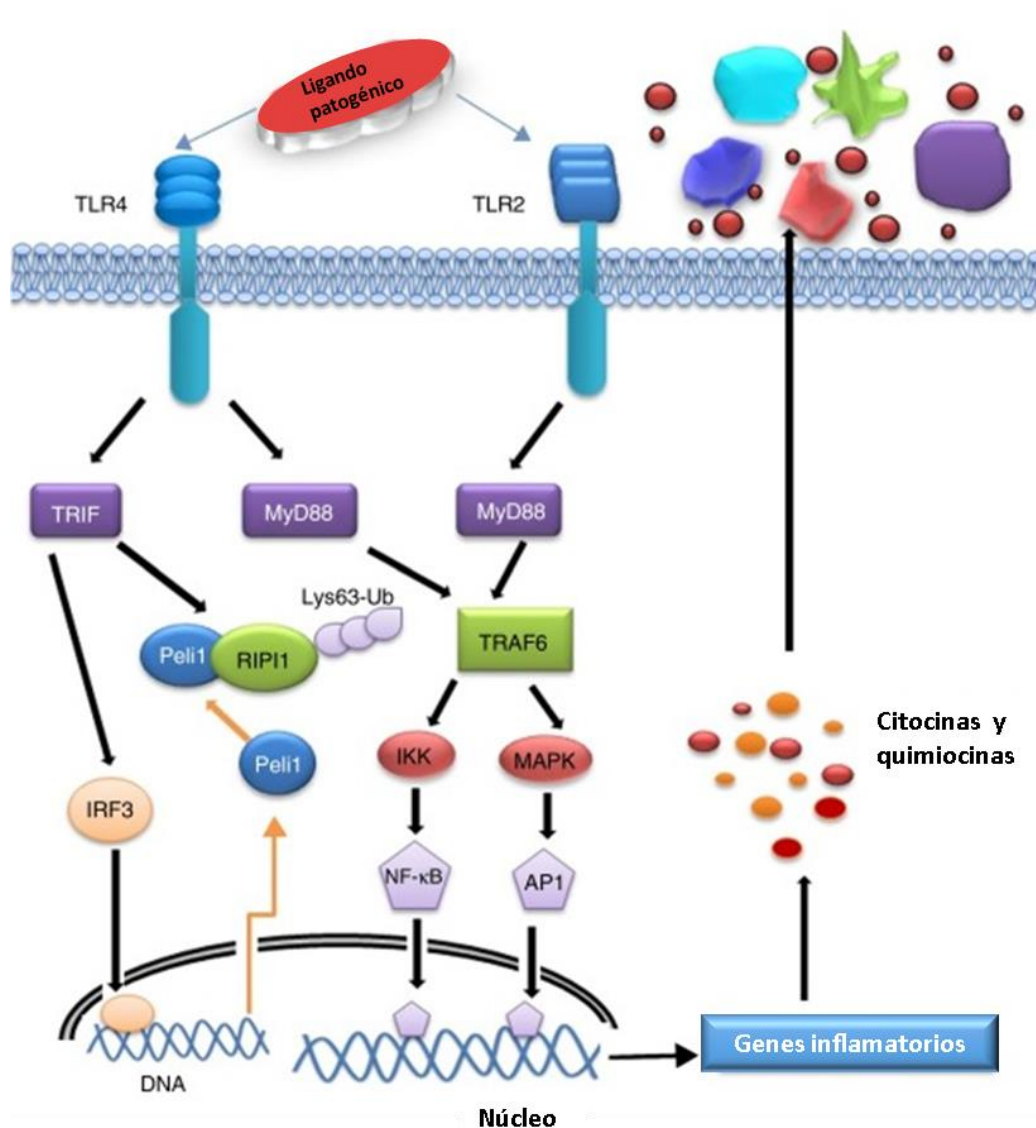
#### **4.3.2 Receptores de reconocimiento de patrones (PRR)**

Ambos tipos celulares (DC y MA) contienen Receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRR) ubicados sobre su superficie celular, en vesículas endosómicas y en citoplasma, que reconocen patrones moleculares asociados a

patógenos (PAMP) generados por patógenos y patrones moleculares asociados a daño (DAMP) generados por células dañadas del mismo organismo. Estos receptores están asociados a vías de transmisión de señales que activan respuestas en la célula, como el favorecimiento de la inflamación (Abbas K., 2020).

Los receptores tipo Toll (TLR) son un ejemplo de PRR, en humanos se han descrito 10 miembros, que reciben su nombre TLR 1 a 10. Por ejemplo, TLR2 reconoce peptidoglicanos, ácido lipoteicóico y lipoproteínas de bacterias Gram positivas; TLR4 reconoce el lipopolisacárido de bacterias Gram negativas, proteínas de choque térmico de 60 y 70kDa, entre otras (Takeda, K., & Akira, S. 2015).

El reconocimiento de PAMP por los TLR, genera el reclutamiento de moléculas adaptadoras como MyD88 que, en términos generales, activa un factor de transcripción (NF- $\kappa$ B) que controla la expresión de las citocinas inflamatorias implicadas en la respuesta inmunitaria (Kawai, T., & Akira, S., 2007, Abbas K., 2020) **(Figura 7)**.



**Figura 7. Vías de señalización de los receptores TLR2 y TLR4**

El reconocimiento de los ligandos de los receptores TLR2 Y 4 activan una cascada de señalización dependiente de MyD88, la cual deriva en la traslocación al núcleo de factores de transcripción que generan la producción de citocinas y quimiocinas inflamatorias (Modificado de Mukherjee, S., Karmakar, S., & Babu, S. P. S. 2016).

Existe evidencia científica que indica que la estimulación de PRR como el TLR-2 aumenta la expresión de proteínas asociadas a las uniones estrechas como ZO-1 y claudina-1 en células epiteliales, mejorando su función de barrera (Ruffner M., 2019). Esta capacidad podría encontrarse también en otros tipos celulares como en células del sistema inmunológico, sin embargo, aún se desconoce en estas células.

## **5. Justificación**

Recientemente en nuestro laboratorio se descubrió que el mRNA de varios genes codificantes de proteínas PDZ se expresan de manera basal en macrófagos y células dendríticas, además de observarse un cambio en la expresión de su mRNA al exponer a estas células ante estímulos PRR dependientes. Entre ellos, se encontró que el mRNA del gen que codifica a la proteína PATJ tiene una tendencia de disminución en MA y una tendencia de aumento en DC ante un estímulo de fagocitosis y un aumento significativo ante un estímulo proinflamatorio. Considerando la importancia de PATJ en funciones como la polaridad celular, uniones estrechas y la formación de redes proteicas en células epiteliales, es posible que, además de los cambios en el mensajero, existan cambios en la expresión y localización subcelular de la proteína PATJ en células dendríticas y macrófagos ante diversos estímulos PRR específicos. Dichos cambios en la proteína podrían apuntar a funciones específicas de PATJ en las células del sistema inmunológico innato.



## **6. Hipótesis**

Con base en los cambios de expresión del mRNA de PATJ que muestran una tendencia de disminución en los macrófagos (MA) y una tendencia de aumento en las células dendríticas (DC) en respuesta a estímulos específicos de distintos PRR, es probable que también existan cambios en la expresión de la proteína PATJ en MA y DC al ser estimuladas mediante diferentes PRR.

## **7. Objetivos**

### **7.1 Objetivo General**

Analizar la expresión de PATJ en las células presentadoras de antígeno profesionales, macrófagos y células dendríticas en respuesta a ligandos de PRR.

### **7.2 Objetivos particulares**

- Obtener macrófagos y células dendríticas por diferenciación a partir de monocitos humanos.
- Analizar cambios en la expresión de PATJ en células dendríticas y macrófagos mediante técnicas de Western blot en respuesta a diferentes estímulos
- Analizar el patrón de expresión subcelular de PATJ en macrófagos y células dendríticas por Inmunofluorescencia.

## **8. Metodología**

### **8.1 Obtención de PBMC**

Se purificaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de concentrados leucocitarios aleatorios de donadores adultos, con edades entre 18-65 años y con peso mayor a 50kg, del banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, tras la aprobación por el comité de ética en investigación del INER (protocolo B16-20). De acuerdo a la legislación nacional y requerimientos institucionales, no se requirió consentimiento informado para este estudio.

El concentrado leucocitario se diluyó en disolución salina de fosfatos (PBS) 1x (Apéndice I) en una relación 1:2. Posteriormente, se estratificó esta suspensión celular sobre un medio de densidad específica (Lymphoprep™ (ProteoGenix #1114545)) en una relación 2:1 y se centrifugó a 800g, 20°C por 25 minutos con aceleración 1 y desaceleración 1. La nube densa con los PBMC se recuperó en un tubo cónico y se lavó con PBS 1x aforando a 50mL y centrifugando a 1600 rpm durante 10 minutos a 20°C. El botón celular se resuspendió en disolución de lisis de eritrocitos (Apéndice 1) y se incubó por 5 minutos a TA. Nuevamente se lavó con PBS 1x aforando a 50 mL y centrifugando a 800rpm por 15 minutos a 20°C. El botón celular se resuspendió en PBS 1x y se realizó el conteo de PBMC en una cámara Neubauer en una dilución 1:10 con azul tripano al 0.04%.

### **8.2 Purificación de monocitos (Mo) CD14+ por selección positiva**

La suspensión celular se centrifugó a 300g por 10 minutos a 4°C. Por cada  $500 \times 10^6$  PBMC obtenidos, se resuspendió el botón celular en 900µL de disolución de Miltenyi (Apéndice1) con 100µL de perlas magnéticas  $\alpha$ - CD14+(Miltenyi Biotec #130-050-201). Se incubó en hielo durante 15 min, y se agitó cada 5 minutos. Se añadieron 10 mL de disolución de Miltenyi y se centrifugó a 300g por 10 minutos a 4°C, se resuspendió el botón celular en 500 µL de disolución de Miltenyi. La suspensión celular se pasó a través de una columna LS (Miltenyi Biotec # 130-042-401) colocada sobre un magneto (previamente equilibrada con 3 mL de disolución de

Miltenyi), luego la columna fue lavada 3 veces con disolución de Miltenyi. Se retiró la columna del magneto para recuperar los Mo CD14+, haciendo pasar disolución de Miltenyi por la columna y aplicando presión con un émbolo. Los Mo CD14+ se lavaron con 10 mL de disolución de Miltenyi y se centrifugó a 1600rpm por 10 minutos a 4°C. El botón celular obtenido se resuspendió en 3-6 mL de medio RPMI (Corning #15-040-CV) completo (adicionado con suero fetal bovino (SFB)( Cytiva # 10703464) 10%, glutamina 2mM (Gibco #02546), Penicilina 100U/mL y estreptomycin 100µg/mL (Gibco # 15140-122) y se realizó el conteo de Mo en una cámara Neubauer en una dilución 1:10 con azul tripano (Sigma Aldrich #23850) al 0.04%.

### **8.3 Diferenciación de Mo CD14+ a macrófagos**

De la suspensión celular de Mo previamente contada, se realizaron dos suspensiones celulares: una con cantidad suficiente para poder tomar  $1.263 \times 10^6$  Mo en 3mL, los cuales fueron sembrados en placas de 6 pozos (para WB); y la otra suspensión celular con cantidad suficiente para poder tomar  $250 \times 10^5$  Mo en 1mL (para IF), los cuales se colocaron directamente sobre cubreobjetos sin tratamiento en una placa de 24 pozos, ambas fueron incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se agregó al medio de todas las placas, la citocina de diferenciación: GM-CSF (10ng/mL medio) en los días 1,3 y 5.

Al día 8 se obtuvieron los MA, se estimularon con LPS (10µg/mL) o *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra viva y/o muerta por calor a una MOI de  $1 \times 10^9$  bacterias/célula.

Las células para IF se estimularon durante 15 min, 30min, 45 min, 2h y 24h. Las células para WB se cosecharon a las 2, 6,12 y 24h después de su estímulo (de la misma forma que los MA sin estímulo): se desechó el medio de los pozos, se lavó 3 veces con PBS 1x, se incubó con 1mL de tripsina 1x a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, y se agitó con micropipeta la tripsina para despegar y recuperar a los MA en un tubo con 5 mL de medio RPMI completo. Se repitió la tripsinización con 700 µL de tripsina 1x. El tubo falcon de 15mL se centrifugó a 1600 rpm y se desechó el sobrenadante. El botón celular se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se centrifugó a 1600rpm por 3 minutos a 20°C y se desechó el sobrenadante, se centrifugó nuevamente a

1600 rpm por 2 minutos a 20°C para asegurar retirar todo el sobrenadante. Los botones celulares se guardaron a -70°C hasta su análisis por WB.

#### **8.4 Diferenciación de Mo CD14+ a células dendríticas**

Los Mo se sembraron con medio RPMI completo a una densidad de  $5 \times 10^6$  Mo/6mL en botellas de cultivo de 25cm<sup>2</sup>, o  $18 \times 10^6$  Mo/20mL en botellas de 75cm<sup>2</sup>, y se cultivaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se agregaron las citocinas de diferenciación GM-CSF (53ng/mL) (Tonbo biosciences #21-8339-U500) e IL-4 (25ng/mL) (Tonbo biosciences #21-8044-U020) en los días 1 y 4. En el día 6, se obtuvieron las DC inmaduras (iDC) que se recuperaron por centrifugación a 1600 rpm por 10 minutos a 20°C. El botón celular se resuspendió en 2-4 mL de medio RPMI completo para realizar el conteo celular en una cámara Neubauer en una dilución 1:10 con azul tripano al 0.04%. Se guardó un botón celular de  $1.5 \times 10^6$  iDC para análisis por Western Blot (WB).

En placas de 12 pozos, se sembraron  $1.5 \times 10^6$  DC/mL de medio (en cada pozo 1.5 mL de la suspensión celular), se estimularon con citocinas de diferenciación y coctel de maduración ((TNF- $\alpha$  (10ng/mL), IL-1 $\beta$  (10ng/mL) (Biolegend #579406) y PGE<sub>2</sub> (1mg/mL) (Sigma P0409)), LPS (10 $\mu$ g/mL) (Sigma Aldrich #L4391) y/o *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Mtb) (ATCC #ATCC-25177) viva y muerta por calor (30 min a 80°C) con una multiplicidad de infección (MOI) de  $1 \times 10^9$  bacterias/célula.

Se cosecharon como células dendríticas maduras (mDC) a los 15min, 30min, 45min, 2h y 24h (para inmunofluorescencia (IF)) y a las 2, 6, 12 y 24 h (para western blot (WB)) después de su estímulo, centrifugando a 1600rpm por 3 minutos a 20°C y desechando el sobrenadante, se centrifugó nuevamente a 1600 rpm por 2 minutos a 20°C para asegurar retirar todo el sobrenadante. Los botones celulares destinados para WB se guardaron a -70°C hasta su posterior análisis; los botones celulares destinados para IF se resuspendieron en medio suficiente para poder tomar  $3 \times 10^5$  iDC o mDC en 60  $\mu$ L. Esos 60  $\mu$ L de la suspensión celular, se colocaron en cada cubreobjeto previamente tratado con Poli-DL-lisina (Sigma Aldrich #P4158) en placas de 24 pozos, y se incubó a TA durante 20 minutos.

## **8.5 Análisis de la expresión subcelular de PATJ por inmunofluorescencia (IF)**

Pasado el tiempo de estimulación o incubación, se desechó el medio de los pozos, y se lavaron las células 2 veces con PBS 1x, se fijaron las células con MeOH frío durante 4 minutos, y se repitieron 2 lavados con PBS 1x. La placa con las células fijadas en PBS 1x se guardó a 4°C hasta su tratamiento.

Los cubreobjetos con las células fijadas MA y DC, se colocaron en un recipiente obscuro sobre parafilm, se bloquearon con 60µL de disolución de bloqueo Cell Staining (BioLegend #420201) durante 20 minutos. Se lavaron los cubreobjetos 3 veces con 60µL de disolución de lavado para IF (Apéndice I) durante 10 minutos cada lavado. Se incubaron durante una hora con 60µL de anticuerpo primario Anti-PATJ (GeneTex #GTX104753) 1:200, 1:500 y 1:1000 (para estandarización), preparados en Cell Staining y se repitieron los 3 lavados de 10 minutos cada uno. Luego se incubó durante una hora con 60µL de anticuerpo secundario Anti- IgG de conejo conjugado con el fluoróforo Cy3 (Jackson ImmunoResearch #711-165-152) 1:1200, y nuevamente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno. Después se incubó 30 min con 60µL de colorante DAPI (Invitrogen #R37606), y se lavaron los cubreobjetos 3 veces, 5 minutos cada uno. Finalmente, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con 5 µL de medio de montaje Prolong Glass (Invitrogen #P26980), se dejaron secar durante 48h a temperatura ambiente en oscuridad y se observaron con el Microscopio Confocal de Barrido Láser Olympus FV1000. Las células se observaron con el objetivo 40x y las imágenes fueron analizadas con el programa FluoView10-ASW 4.2, incorporado al microscopio.

## **8.6 Análisis de la expresión de PATJ por Western Blot (WB)**

### **8.6.1 Lisis celular**

Se descongeló el botón celular obtenido de las muestras para WB, y en base a su tamaño se determinó la cantidad de Buffer RIPA (Sigma Aldrich #R0278) con inhibidor de proteasas (Sigma Aldrich #P8340) usado, se activó la lisis raspando los tubos en la gradilla. Se incubó en hielo durante 15 minutos y se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C durante 15 minutos, para recuperar el sobrenadante en otro tubo.

### **8.6.2 Cuantificación de proteína**

Se utilizó el Kit de DC™ Protein Assay (Bio-Rad #5000112). En una placa ELISA de 96 pozos se colocaron 5µL del blanco, curva estándar de BSA o lisado celular en cada pocillo, se le agregaron 25 µL de reactivo AS (en cada 1000 µL de reactivo AS, 20 µL son de reactivo S) y 200 µL de reactivo B. Se incubó la placa a TA durante 15 minutos y se midió su absorbancia a 750nm.

### **8.6.3 SDS-PAGE**

Se prepararon las muestras con buffer de carga 6x para cargar 70 µg de proteína en geles de poliacrilamida al 7.5%. Se montaron los geles en los tanques y se agregó disolución de electroforesis 1x (Apéndice I) se corrió el gel concentrador a 85V, aproximadamente 30 min, y el gel separador a 120V aproximadamente durante hora y media.

### **8.6.4 Western Blot**

Se utilizaron membranas de PVDF previamente activadas con MeOH durante 15 minutos, se montó el sándwich de transferencia y se corrió la transferencia húmeda a 100V durante 1 hora con disolución de transferencia 1x (Apéndice I), con el tanque sumergido en hielo. Las membranas se bloquearon con leche al 5% en disolución salina tamponada con TRIS (TBS) 1x durante 1 hora, luego se cortó la membrana y se incubaron las partes correspondientes con anticuerpo primario PATJ 1:500 (el mismo utilizado para IF) y GAPDH 1:2000 (GeneTex #GTX627408), β-Actina 1:5000 (donación) o β-Tubulina 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology #sc-9104) toda la noche a 4°C en movimiento constante. Las membranas se lavaron 4 veces con disolución de lavado para WB (Apéndice 1) en movimiento constante, 10 minutos cada lavado, para luego ser incubado con anticuerpo secundario 1:2000 respectivo, acoplado a una peroxidasa (HRP): Anti- IgG de conejo (Cell Signaling #7074) para PATJ, β-Actina o β-Tubulina y Anti- IgG de ratón (Cell Signaling #7076) para GAPDH, durante una hora en movimiento constante. Se repitieron los 4 lavados de 10 minutos cada uno con disolución de lavado. Se expusieron las membranas en sustrato Immobilon quimioluminiscente de HRP (Millipore #WBKLS0100) durante 3

minutos en oscuridad y se reveló en el equipo ChemiDoc XRS+ de BIO-RAD. Finalmente se realizó un análisis densitométrico con el programa ImageLab 6.1 de las bandas obtenidas por Western Blot, y su análisis estadístico con ANOVA de una vía, con una confianza del 95% y post-prueba de Dunnet con el programa GraphPad Prism 7.

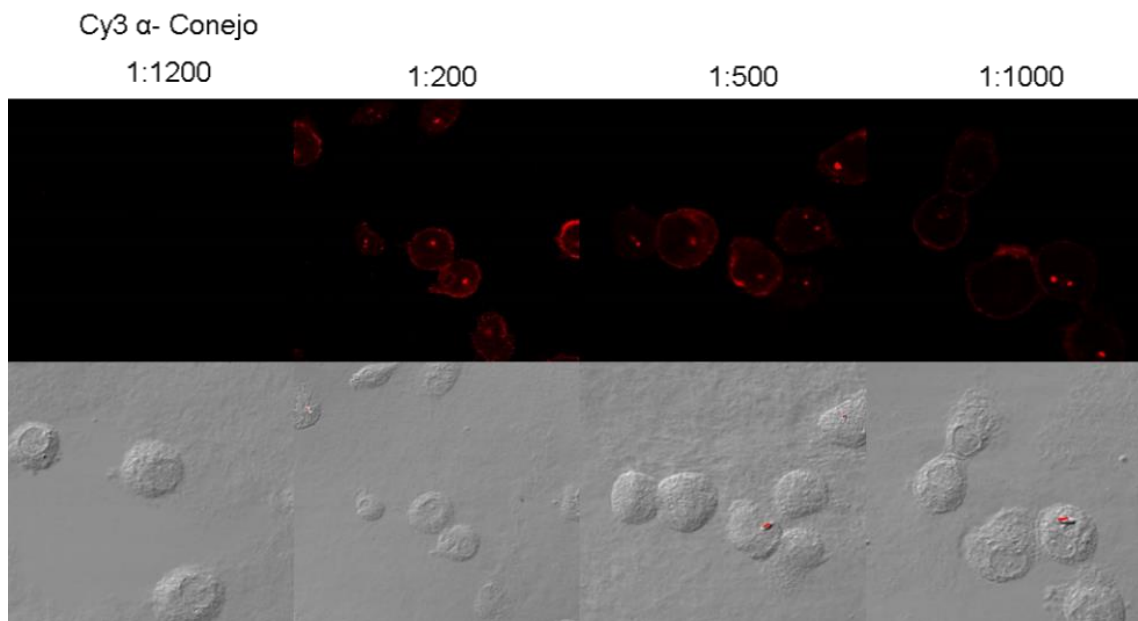
## 9. Resultados

Para investigar la expresión de la proteína PATJ en CPA, se realizaron análisis de Inmunofluorescencia y Western blot.

### 9.1 Titulación de anticuerpos en macrófagos y células dendríticas

Para obtener la mejor señal posible en la técnica de inmunofluorescencia, se realizó una titulación del anticuerpo anti-PATJ tanto en MA como en DC, en las diluciones 1:200, 1:500 y 1:1000. La incubación de las células fijadas únicamente con anticuerpo secundario (Cy3  $\alpha$ -Conejo) fungió como control negativo.

Los resultados indican que la mejor dilución es 1:500 en MA, ya que como se puede observar en la **figura 8**, se pierde un poco de señal en la dilución 1:1000 comparada con 1:500 y 1:200, las cuales muestran una señal parecida.

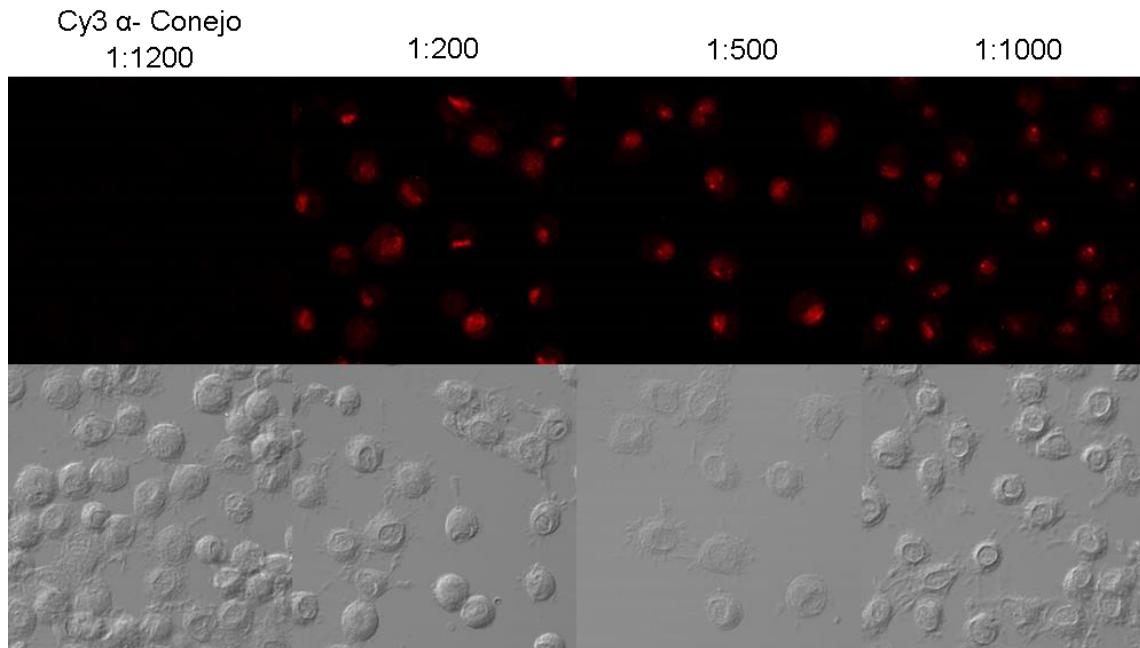


**Figura 8. Comparación entre diluciones del anticuerpo que reconoce PATJ para IF en MA sin estímulo.**

En la parte superior izquierda se observa la fluorescencia únicamente del Ac. Secundario como control, y en la parte superior derecha la fluorescencia de la proteína PATJ en las diluciones mostradas. En la parte inferior se muestran los Macrófagos en campo claro.



De igual manera, los resultados de la **figura 9** muestran que la mejor dilución para las DC también es 1:500, pues en 1:1000 se pierde un poco de señal comparada con 1:500 y 1:200 que muestran una señal semejante.

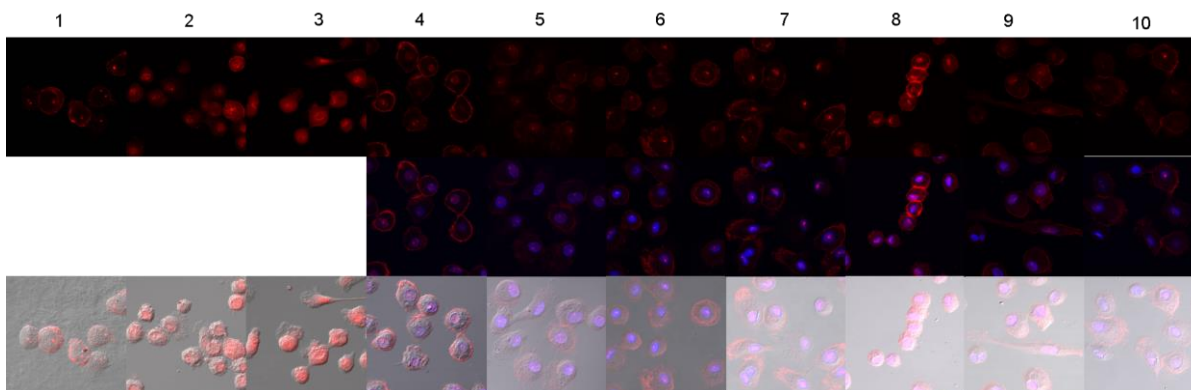


**Figura 9. Comparación entre diluciones del anticuerpo que reconoce PATJ para IF en IDC**

En la parte superior izquierda se observa la fluorescencia únicamente del Ac. Secundario como control, y en la parte superior derecha la fluorescencia de la proteína PATJ en las diluciones mostradas. En la parte inferior se muestran las células dendríticas en campo claro.

## **9.2 Localización intracelular de PATJ en MA basal y en respuesta a ligando de PRR**

Lo siguiente fue analizar la localización subcelular de PATJ en MA, la cual se observó en 10 diferentes individuos (**Figura 10**). PATJ se encontró en la mayoría de los individuos en lo que parece ser la membrana celular, dispersa y/o concentrada en puntos en el núcleo, y en menor medida en el citoplasma.

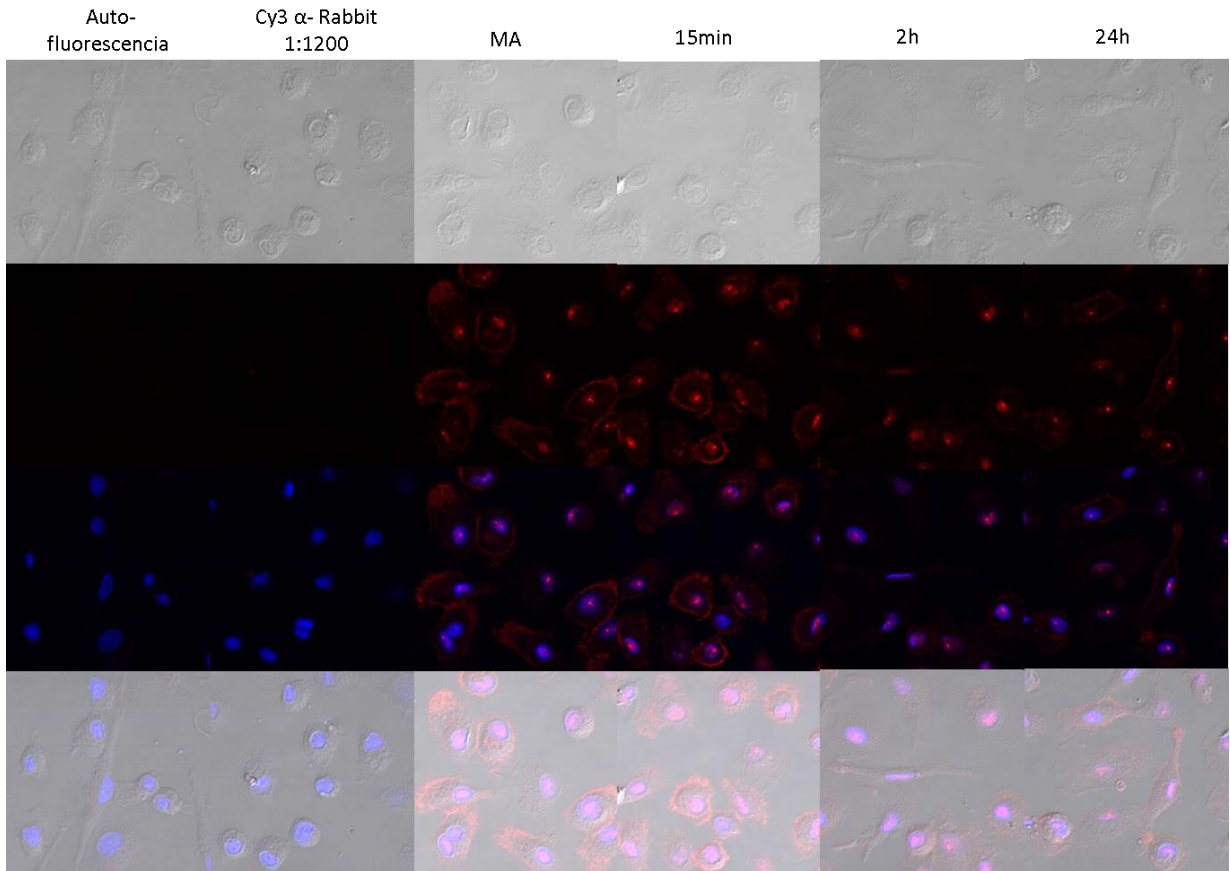


**Figura 10. Localización de PATJ en MA sin estímulo.**

Comparación de MA sin estímulo de 10 diferentes individuos. En la fila superior se observa la fluorescencia de PATJ, en la fila de en medio la sobreposición de PATJ en rojo y el núcleo en azul. En la fila inferior se encuentra la sobreposición de las células en campo claro, el núcleo y la proteína PATJ.

Seguido de esto, se analizó si la localización subcelular de PATJ cambiaba al exponer a los MA con estímulos PRR específicos LPS (vía TLR-4) y, con la cepa de laboratorio *M. tuberculosis* (Mtb) H37Ra viva (vía TLR-2, 4 y 9) y muerta por calor (HKMtb) (vía CR3) a diferentes tiempos.

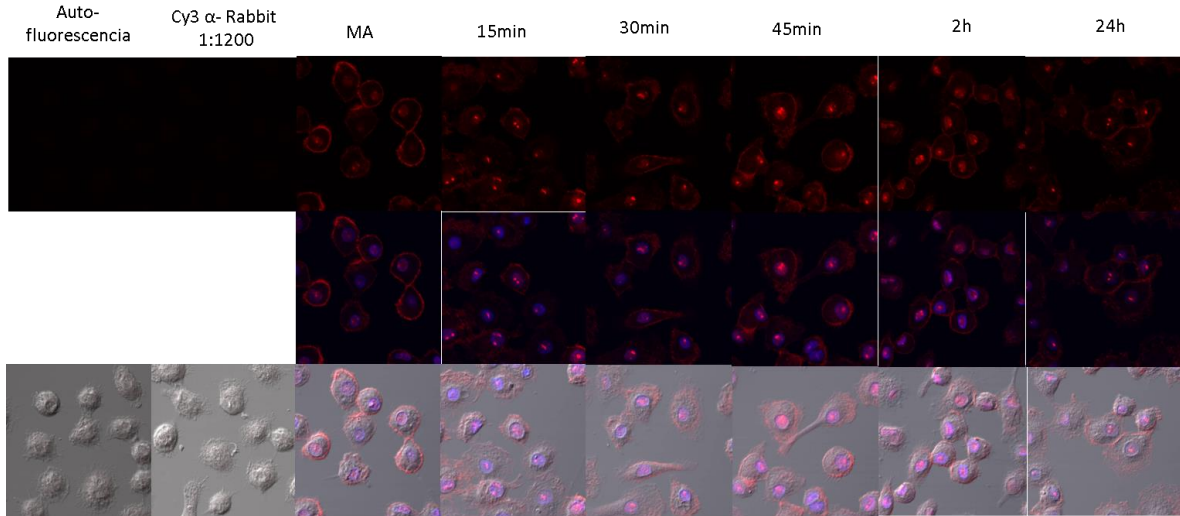
En células estimuladas con LPS (**figura 11**), se observa que PATJ cambia su localización ante el estímulo vía TLR4, ya que tiene una menor localización en membrana a partir de los 15 minutos con el estímulo, en citoplasma aumenta a los 15 minutos y disminuye casi por completo a las 2 y 24 horas, sin embargo, su localización nuclear puntual se mantiene en todos los tiempos.



**Figura 11. Localización de PATJ en MA estimulados con LPS.**

En la primera columna se muestra el control de la autofluorescencia de los MA, en la segunda columna la fluorescencia del Ac. Secundario como control, en las columnas restantes la fluorescencia de PATJ en los MA sin estímulo y estimulados con LPS en los tiempos mostrados. Imágenes representativas de cinco individuos analizados.

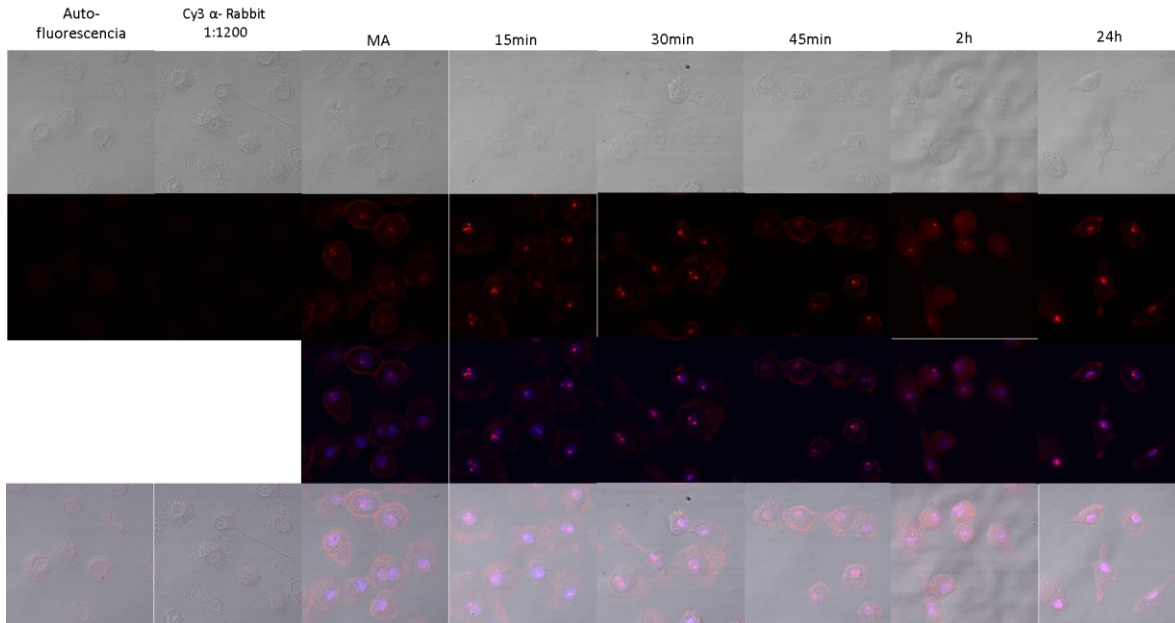
En la cinética de células estimuladas con HKMtb (**figura 12**), en la estimulación vía CR3, parece haber un cambio en la localización desde la membrana al núcleo, a partir de los 15 minutos con el estímulo se encuentra una mayor acumulación puntual de PATJ en el núcleo, y una disminución en la localización en membrana. La señal en membrana comienza a retornar a partir del minuto 45 mientras que la señal en citoplasma se mantiene ligera en todos los tiempos observados.



**Figura 12. Localización de PATJ en MA estimulados con Mtb muerta por calor (HKMtb).**

En la primera columna se muestra el control de la autofluorescencia de los MA, en la segunda columna la fluorescencia del Ac. Secundario como control, en las columnas restantes la fluorescencia de PATJ en los MA sin estímulo y estimulados con Mtb muerta por calor en los tiempos mostrados. Imágenes representativas de dos individuos analizados.

En la cinética de células estimuladas por fagocitosis con Mtb viva (vía TLR 2,4 y 9) (**figura 13**) a partir de los 15 minutos con el estímulo se encuentra una acumulación de la proteína en el núcleo y una disminución en la localización en membrana como en el caso de la estimulación con HKMtb, sin embargo, en este caso también disminuye la señal en citoplasma desde los 15 minutos, y aumenta hasta las 2 horas.

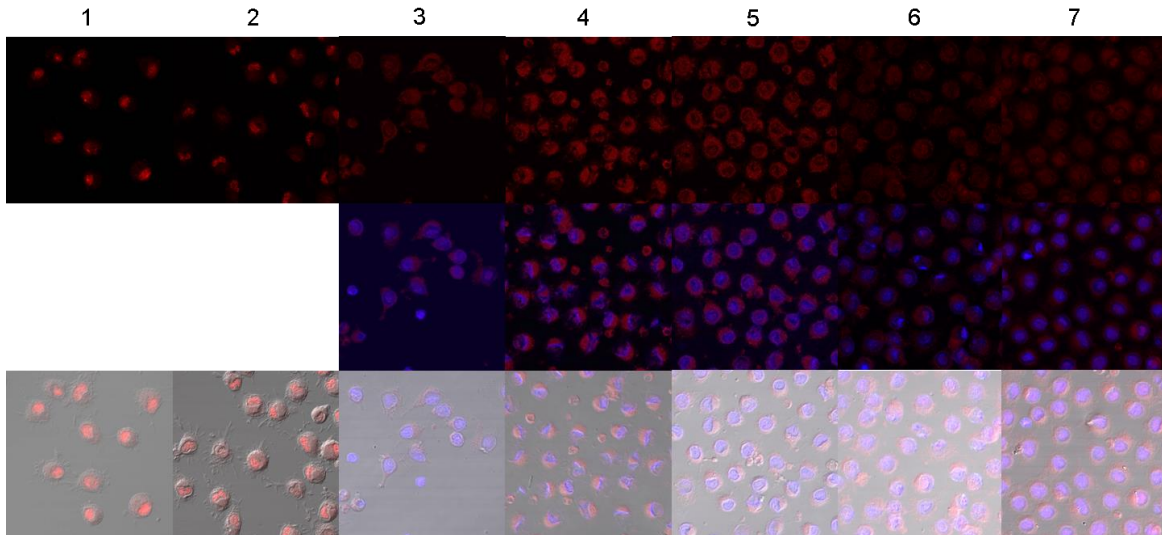


**Figura 13. Localización de PATJ en MA estimulados con Mtb viva.**

En la primera columna se muestra el control de la autofluorescencia de los MA, en la segunda columna la fluorescencia del Ac. Secundario como control, en las columnas restantes la fluorescencia de PATJ en los MA sin estímulo y estimuladas con Mtb viva en los tiempos mostrados. Imágenes representativas de dos individuos analizados.

### 9.3 Localización intracelular de PATJ en DC basal y en respuesta a ligando de PRR

También se analizó la localización subcelular de PATJ en DC, primero su localización en DC sin estímulo, es decir iDC, en siete individuos diferentes (**figura 14**). Se encontró que la intensidad de la señal fue muy diferente entre individuos, sin embargo, se observa que PATJ se encuentra tanto en citoplasma como en núcleo. A diferencia de los MA, PATJ no se encuentra en membrana plasmática en DC y su localización en núcleo no es puntual, sino dispersa.

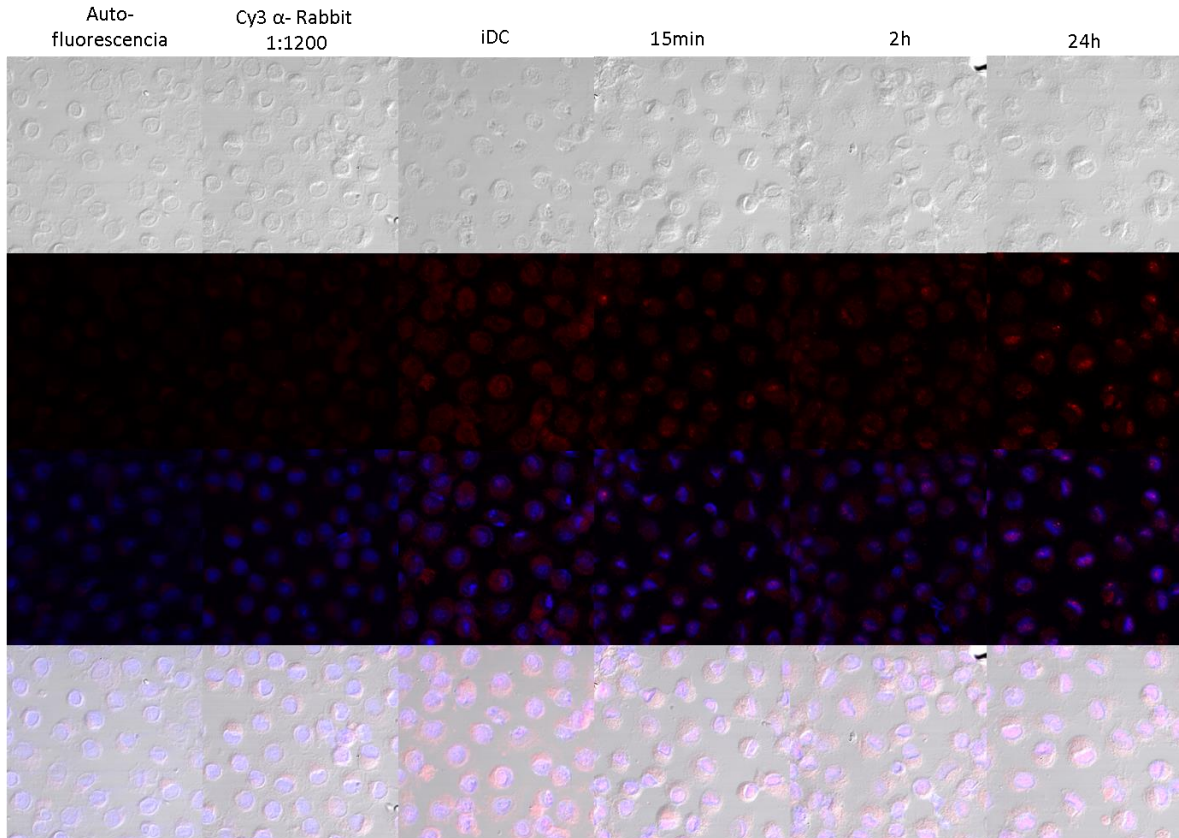


**Figura 14. Localización de PATJ en iDC.**

Comparación de iDC de 7 diferentes individuos. En la fila superior se observa la fluorescencia de PATJ, en la fila de en medio la sobreposición de PATJ en rojo y el núcleo en azul. En la fila inferior se encuentra la sobreposición de las células en campo claro, el núcleo y la proteína PATJ. (Luz de individuos 3,4 y 5 corregidas con powerpoint)

Para saber si PATJ modificaba su localización, se utilizaron los mismos estímulos que con los MA, además de un coctel de maduración (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y PGE $_2$ ).

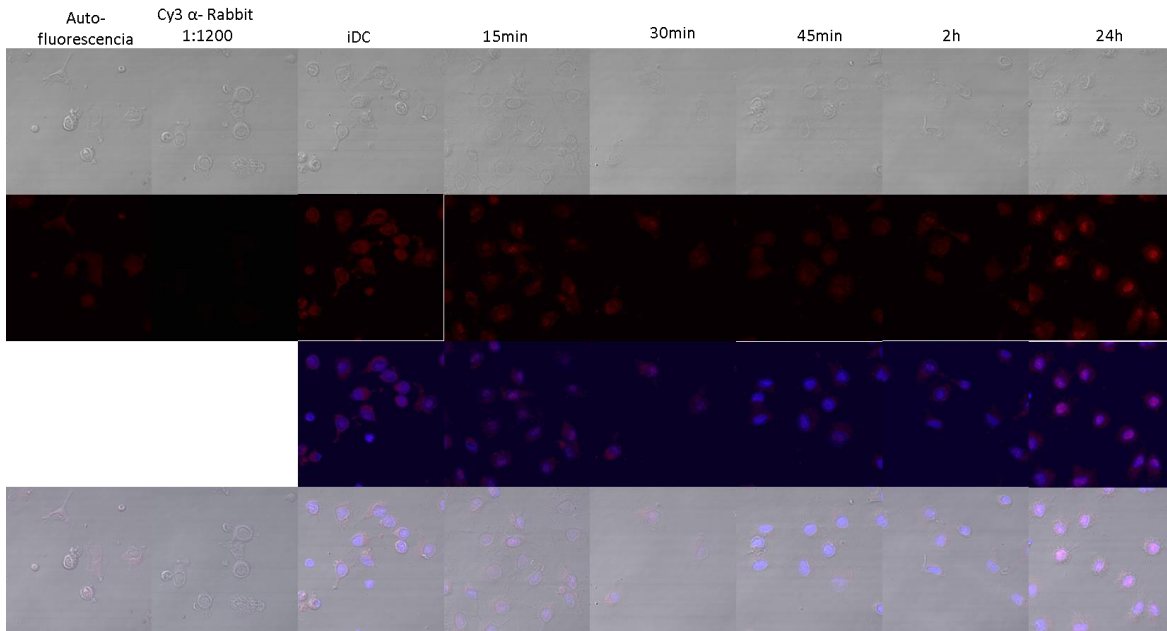
En células estimuladas vía TLR4 con LPS (**figura 15**), se observa una menor señal en citoplasma y una señal ligeramente mayor en núcleo a partir de los 15 minutos con el estímulo en algunas células. A las 24 horas la señal en núcleo se ve más fuerte en la mayoría de las células.



**Figura 15. Localización de PATJ en DC estimuladas con LPS.**

En la primera columna se muestra el control de la autofluorescencia de las iDC, en la segunda columna la fluorescencia del Ac. Secundario como control, en las columnas restantes la fluorescencia de PATJ en las DC no estimuladas y estimuladas con LPS en los tiempos mostrados.

En la cinética de células estimuladas vía CR3 con HKMtb (**figura 16**) se observa una ligera disminución de la señal de PATJ en citoplasma desde los 15 minutos con el estímulo, y a las 24horas la mayor señal se encuentra en núcleo.

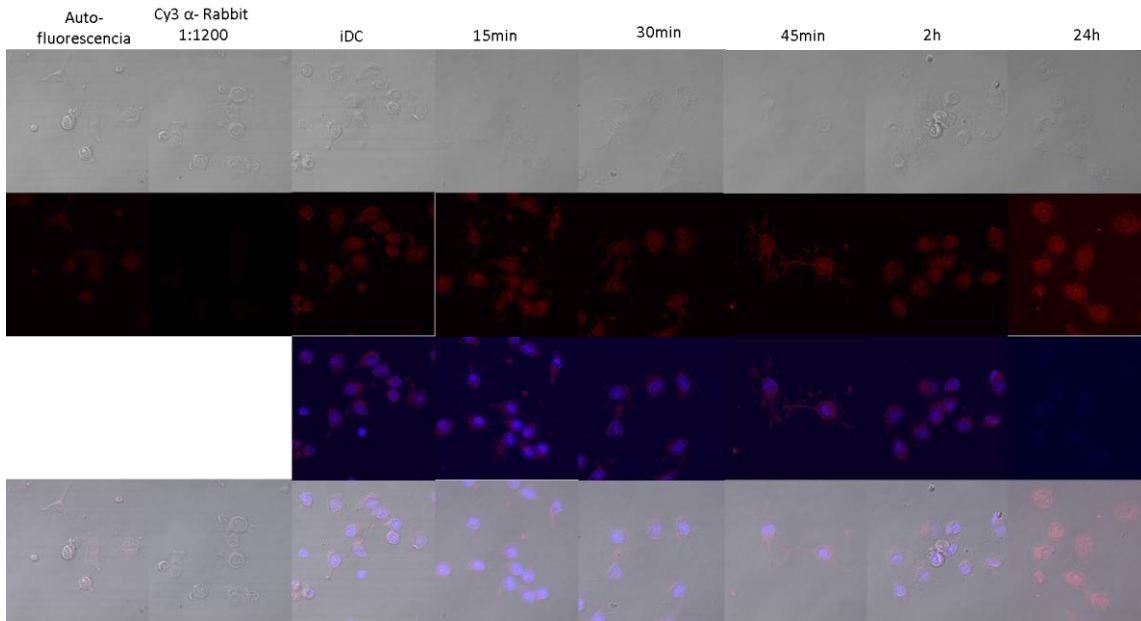


**Figura 16. Localización de PATJ en DC estimulados con Mtb muerta por calor (HKMtb).**

En la primera columna se muestra el control de la autofluorescencia de los DC, en la segunda columna la fluorescencia del Ac. Secundario como control, en las columnas restantes la fluorescencia de PATJ en los MA sin estímulo y estimuladas con Mtb muerta por calor en los tiempos mostrados. Imágenes representativas de un individuo analizado. (Corrección de luz con powerpoint)

En la cinética de células estimuladas por fagocitosis con Mtb viva (vía TLR-2,4 y 9) (**figura 17**) se observa un ligero aumento de la señal de PATJ a los 15 minutos en núcleo, sin embargo, la señal se mantiene parecida en todos los tiempos, aunque se observa que PATJ también se encuentra en las dendritas de las DC.

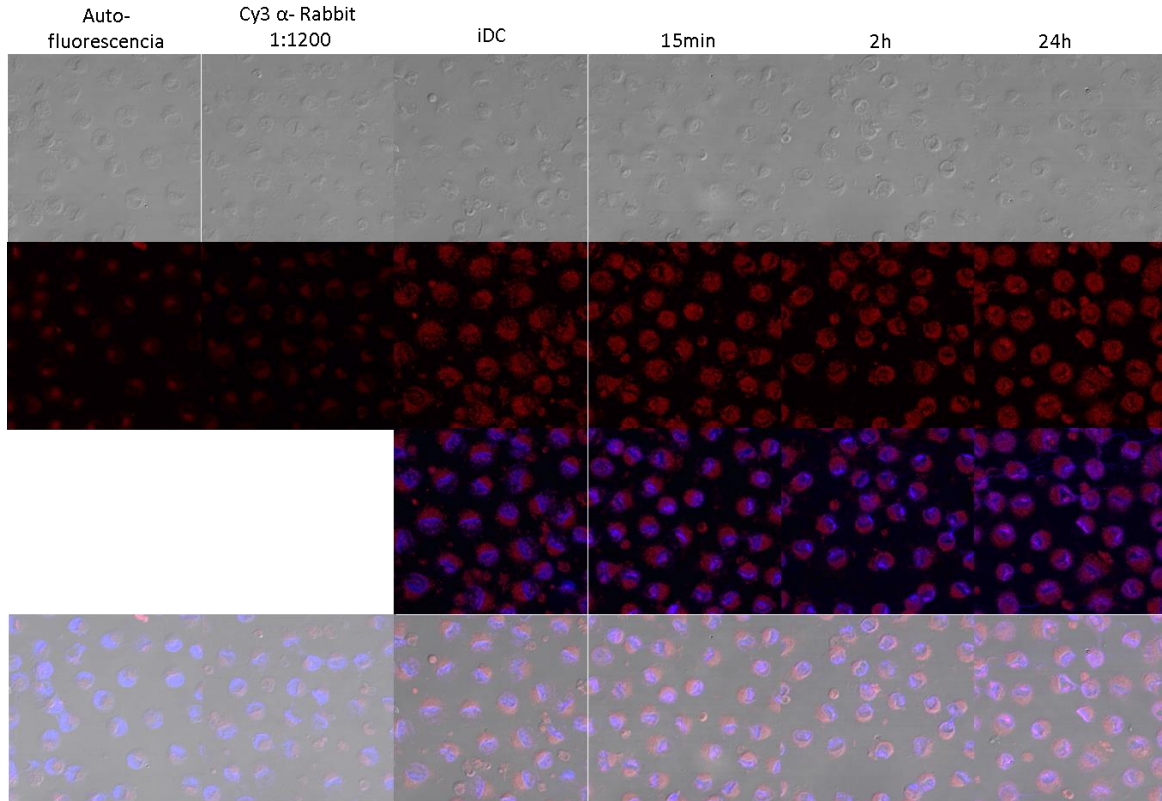




**Figura 17. Localización de PATJ en DC estimulados con Mtb viva**

En la primera columna se muestra el control de la autofluorescencia de los DC, en la segunda columna la fluorescencia del Ac. Secundario como control, en las columnas restantes la fluorescencia de PATJ en los MA sin estímulo y estimuladas con Mtb viva en los tiempos mostrados. Imágenes representativas de un individuo analizado. (Corrección de luz con powerpoint)

Finalmente, en células estimuladas con el coctel de maduración (**figura 18**) comparadas con las iDC, se observa un ligero aumento en la señal en núcleo solo hasta las 24 horas con el estímulo.



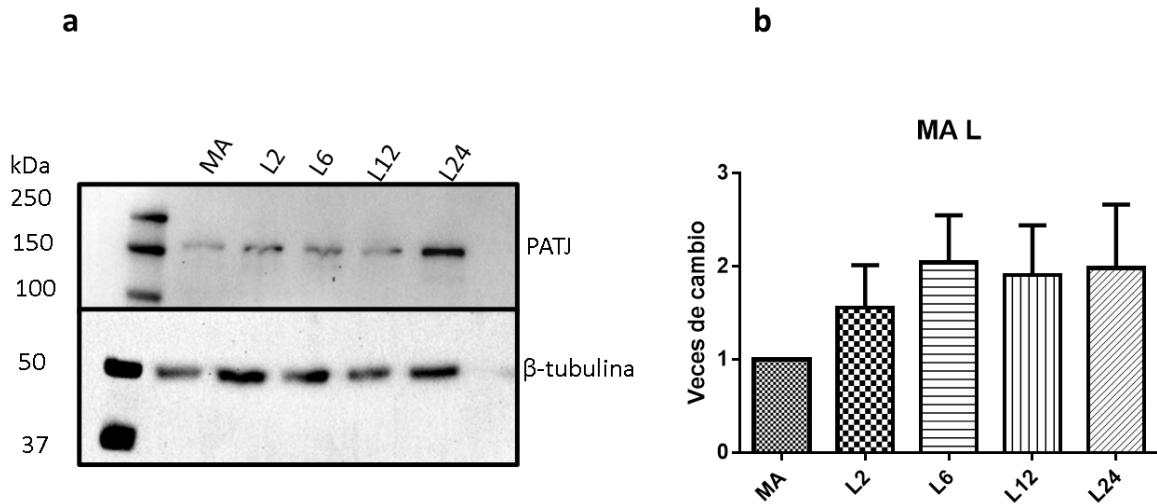
**Figura 18. Localización de PATJ en DC estimulados con Cóctel de maduración**

En la primera columna se muestra el control de la autofluorescencia de los DC, en la segunda columna la fluorescencia del Ac. Secundario como control, en las columnas restantes la fluorescencia de PATJ en los MA sin estímulo y estimuladas con Cóctel de maduración en los tiempos mostrados. Imágenes representativas de un individuo analizado. (Corrección de luz con powerpoint)

#### 9.4 Análisis de los cambios de expresión de PATJ en MA y DC mediante WB

Para determinar si la proteína PATJ regula su expresión bajo estímulos PRR específicos se realizó un análisis por WB en ambos tipos celulares con los mismos estímulos utilizados en la IF, analizando una cinética a partir de las 2, 6, 12 y hasta las 24 horas con el estímulo.

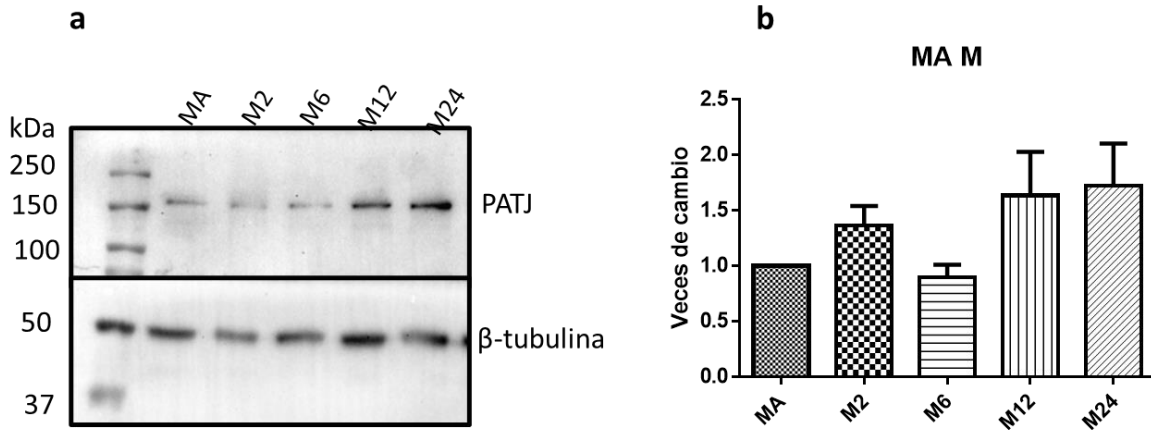
En MA estimulados con LPS se puede observar una tendencia de aumento en la expresión de PATJ desde las 2 a las 24 horas con el estímulo en comparación con los MA sin estímulo, sin embargo, no se observan cambios estadísticamente significativos en ningún tiempo (**figura 19**).



**Figura 19. Expresión de PATJ en MA estimulados con LPS.**

**a** Western blot representativo de 6 individuos. **b** Gráfica de barras de los promedios de las áreas bajo la curva de las bandas recuperadas del western blot, normalizadas contra el control. No se observó diferencia significativa al realizar un análisis estadístico de ANOVA de una vía, con una confianza del 95% y una post-prueba de Dunnet. La barra indica el error estándar. MA: Macrófagos; L: Lipopolisacárido; 2,6, 12 y 24: horas después del estímulo.

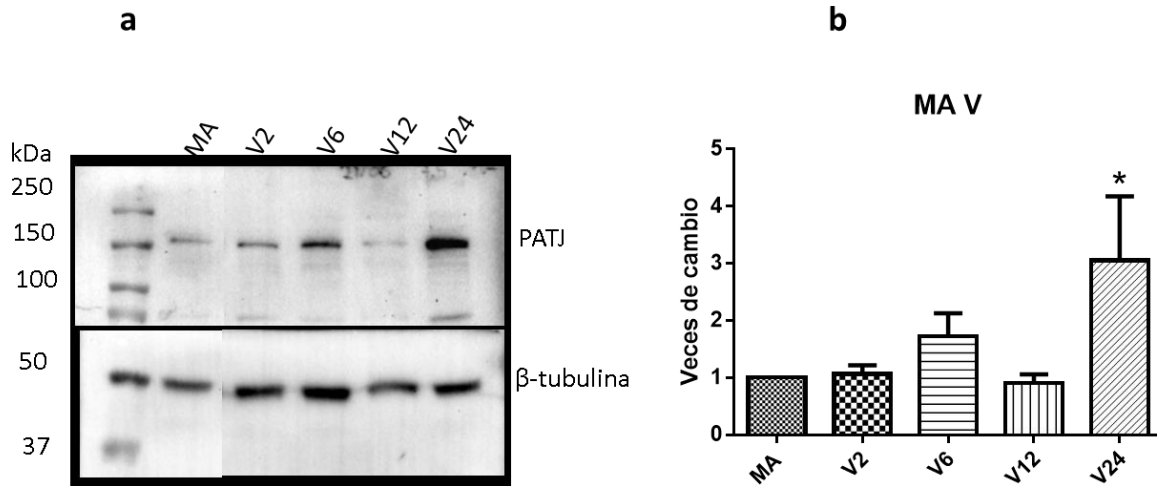
En MA estimulados con HKMtb se observa una ligera disminución en la expresión de PATJ a las 6 horas con el estímulo, y un aumento en la expresión a las 12 y 24 horas, sin embargo, no se observan cambios estadísticamente significativos (**figura 20**).



**Figura 20. Expresión de PATJ en MA estimulados con Mtb muerta por calor (HKMtb).**

**a** Western blot representativo de 4 individuos. **b** Gráfica de barras de los promedios de las áreas bajo la curva de las bandas recuperadas del western blot, normalizadas contra el control. No se observó diferencia significativa al realizar un análisis estadístico de ANOVA de una vía, con una confianza del 95% y una post-prueba de Dunnet. La barra indica el error estándar. MA: Macrófagos; M: *M. tuberculosis* muerta por calor; 2,6, 12 y 24: horas después del estímulo.

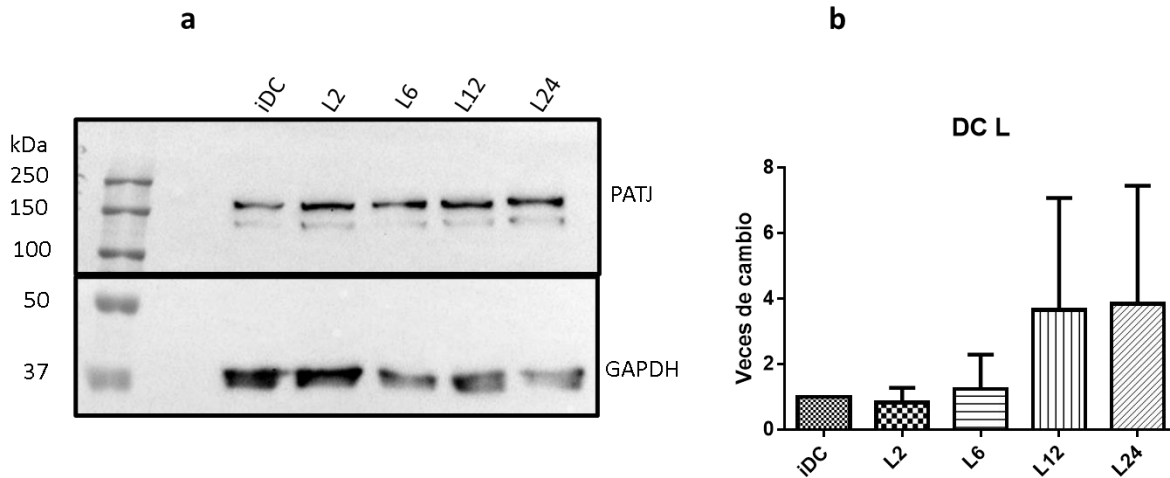
En MA estimulados con Mtb viva se observa un aumento en la expresión de PATJ a las 2 y 6 horas con el estímulo, una disminución a las 12 horas y nuevamente un aumento a las 24 horas, el cual resultó ser estadísticamente significativo con respecto a los MA sin estímulo (**figura 21**).



**Figura 21. Expresión de PATJ en MA estimulados con Mtb viva.**

**a** Western blot representativo de 5 individuos. **b** Gráfica de barras de los promedios de las áreas bajo la curva de las bandas recuperadas del western blot, normalizadas contra el control. Se observó una diferencia significativa al realizar el análisis estadístico de ANOVA de una vía, con una confianza del 95% y una post-prueba de Dunnet. La barra indica el error estándar. MA: Macrófagos; M: *M. tuberculosis* viva; 2,6, 12 y 24: horas después del estímulo.

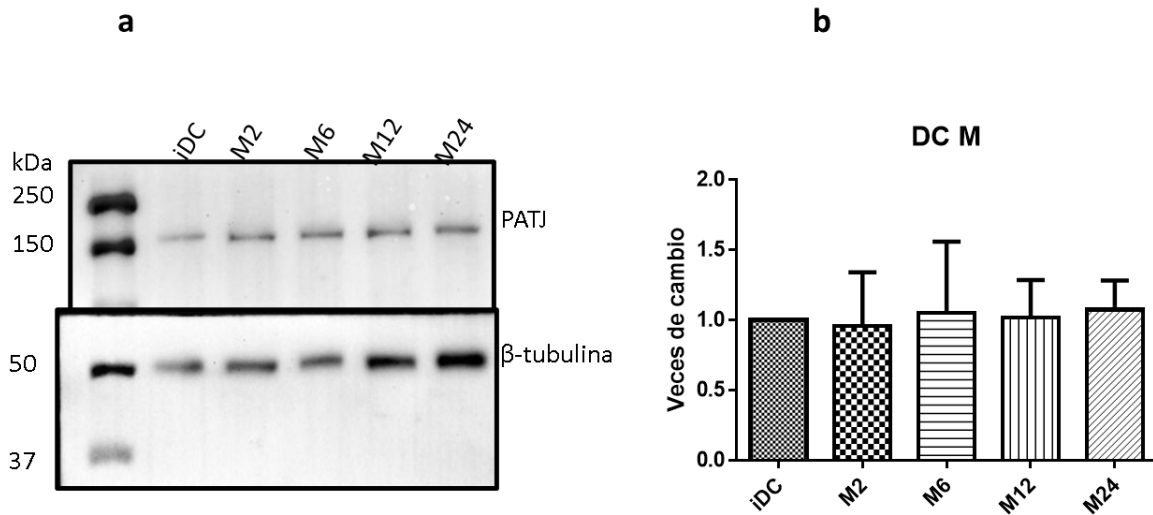
En el caso de las DC estimuladas con LPS, se observa un aumento en la expresión de PATJ desde las 2 horas con el estímulo, sin embargo, no se encontraron cambios estadísticamente significativos (**figura 22**).



**Figura 22. Expresión de PATJ en DC estimulados con LPS.**

**a** Western blot representativo de 3 individuos. **b** Gráfica de barras de los promedios de las áreas bajo la curva de las bandas recuperadas del western blot, normalizadas contra el control. No se observó diferencia significativa al realizar un análisis estadístico de ANOVA de una vía, con una confianza del 95% y una post-prueba de Dunnet. La barra indica el error estándar. DC: Células Dendríticas; L: Lipopolisacárido; 2, 6, 12 y 24: horas después del estímulo.

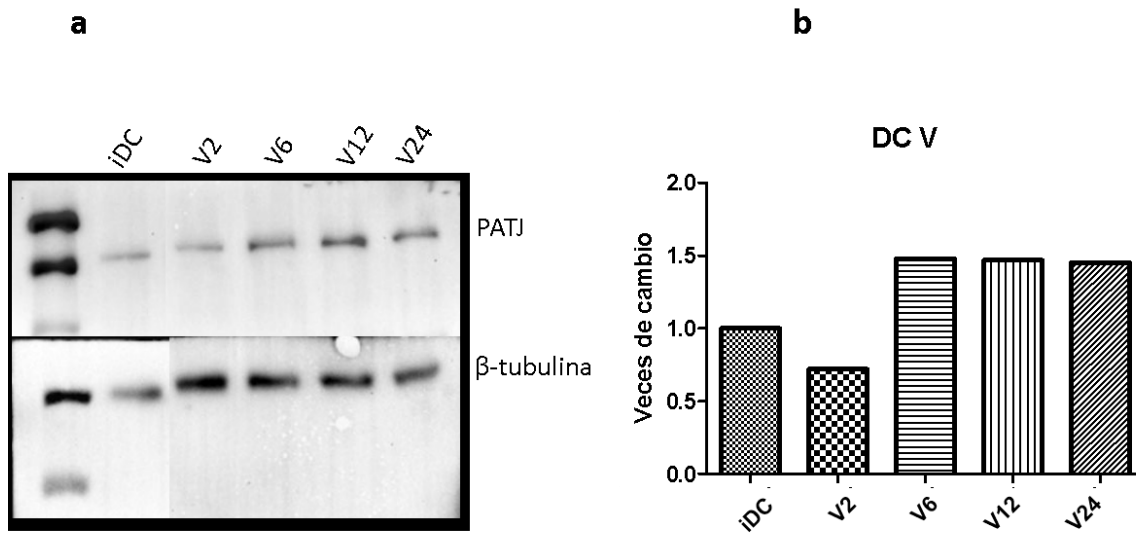
En las DC estimuladas con HKMtb se observa una respuesta similar en todos los tiempos de estimulación, parece que no hay modificaciones en la expresión de PATJ, por lo cual, no se encontraron cambios estadísticamente significativos (**figura 23**).



**Figura 23. Expresión de PATJ en DC estimulados con Mtb muerta por calor.**

**a** Western blot representativo de 3 individuos. **b** Gráfica de barras de los promedios de las áreas bajo la curva de las bandas recuperadas del western blot, normalizadas contra el control. No se observó diferencia significativa al realizar un análisis estadístico de ANOVA de una vía, con una confianza del 95% y una post-prueba de Dunnet. La barra indica el error estándar. DC: Células Dendríticas; M: *M. tuberculosis* muerta por calor; 2,6, 12 y 24: horas después del estímulo.

En DC estimuladas con Mtb viva se observa una ligera disminución de la expresión de PATJ a las 2 horas con el estímulo, y un aumento en la expresión desde las 6 horas (figura 24).

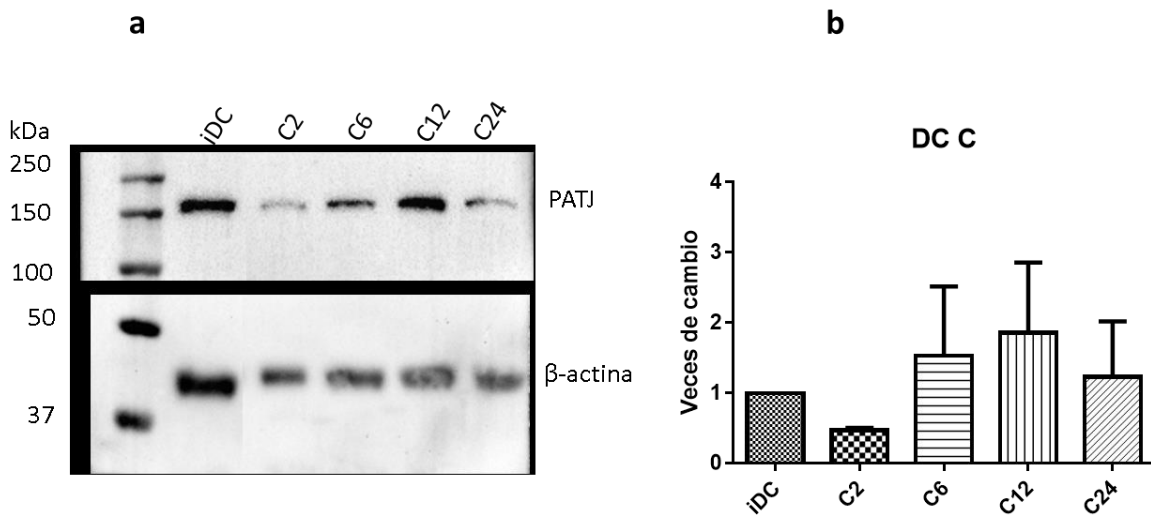


**Figura 24. Expresión de PATJ en DC estimulados con Mtb viva.**

**a** Western blot, un solo individuo. **b** Gráfica de barras del área bajo la curva de las bandas recuperadas del western blot, normalizadas contra el control. DC: Células Dendríticas; M: *M. tuberculosis* viva 2,6, 12 y 24: horas después del estímulo.



En DC estimuladas con coctel de maduración se observa una disminución de la expresión de PATJ a las 2 horas con el estímulo, un aumento en la expresión a las 6 y 12 horas, y nuevamente una disminución a las 24 horas, sin embargo, no se encontraron cambios estadísticamente significativos (**figura 25**).



**Figura 25. Expresión de PATJ en DC estimulados con Cóctel de maduración.**

**a** Western blot representativo de 3 individuos. **b** Gráfica de barras de los promedios de las áreas bajo la curva de las bandas recuperadas del western blot, normalizadas contra el control. No se observó diferencia significativa al realizar un análisis estadístico de ANOVA de una vía, con una confianza del 95% y una post-prueba de Dunnet. La barra indica el error estándar. DC: Células Dendríticas; C: Cóctel de Maduración; 2,6, 12 y 24: horas después del estímulo.

Con los resultados obtenidos a partir del Western blot, se encontró un aumento significativo en la expresión de PATJ en MA con el estímulo de Mtb viva a las 24 horas, y a pesar de que no se observaron cambios estadísticamente significativos con los demás estímulos, en general, con la mayoría de ellos, tanto en MA como en DC, la proteína PATJ tiende a aumentar.

## 10. Discusión

Las proteínas PDZ están involucradas en muchos procesos celulares, y su amplia conservación entre especies indica una gran importancia en las funciones celulares. En humanos se han encontrado varias proteínas PDZ, de las cuales se han descrito funciones mayormente en neuronas y células epiteliales (Barreda D., *et. al.*, 2020).

Algunas de estas proteínas también se han estudiado en células del sistema inmunológico, principalmente en células del sistema inmunológico adaptativo como linfocitos T y B. Sin embargo, el interés por conocer la funcionalidad de estas proteínas en el sistema inmunológico innato ha aumentado en la última década, por lo que ya se sabe, por ejemplo, de la importancia fundamental de Scrib para la producción de ROS en MA (Zheng, W. *et. al.* 2016).

Recientemente, el grupo de estudio del laboratorio de transcriptómica e inmunología molecular, analizó la expresión génica de 83 genes PDZ en MA y DC estimuladas a través de diversos PRR. Se encontró que un 90% de estos genes se expresaban de forma basal en este tipo de células, además, algunos de ellos tuvieron cambios significativos en los perfiles transcripcionales con los estímulos utilizados (Rosas G., *et.al.*, 2022). PATJ fue uno de los genes que mostró diferencias significativas en DC a nivel de mRNA. Aquí, se realizó el análisis de la expresión de PATJ a nivel proteína en MA y DC.

Se encontró que PATJ se expresa de manera basal en MA y DC, lo cual sugiere que esta proteína lleva a cabo funciones importantes aún no conocidas en este tipo de células del sistema inmunitario innato.

La localización de PATJ solamente ha sido reportada en células epiteliales, en las uniones estrechas, membrana apical (Lemmers, C., *et.al.*, 2002), en citosol con enriquecimiento en la zona perinuclear (Duning, K., *et.al.*, 2008) y en núcleo en células progenitoras de la retina (Kim J.Y., *et al.*, 2015). Nosotros encontramos que la localización subcelular es diferente en MA y DC. Si bien, ambos tipos celulares comparten la localización en citoplasma y núcleo, la expresión no parece ser la misma, ya que en MA la localización en núcleo es dispersa y concentrada en zonas del mismo (**figura 10**), mientras que en las DC solo se encuentra dispersa (**figura**

14); la expresión en citoplasma parece ser menor en MA que en DC, además PATJ se localiza también en lo que parece ser la membrana plasmática únicamente en MA.

Se ha reportado que algunas proteínas PDZ mantienen una translocación activa entre el citoplasma y el núcleo (Gallego G., H., *et.al.*, 2021, Deevi, R. K., *et.al.*, 2014). Por ejemplo, proteínas PDZ que juegan un papel importante en la regulación de la estabilidad de ciertos factores de transcripción, como la proteína PDLIM2 que además de ser necesaria para la migración celular polarizada, regula al factor NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa-B) (Deevi, R. K., *et.al.*, 2014), el cual es vital para inducir la expresión de una variedad de genes implicados en la respuesta inmunitaria.

Por otro lado, se sabe que PATJ es capaz de unirse a un coactivador transcripcional, YAP1, perteneciente a la vía Hippo, una vía de señalización que controla la proliferación, crecimiento y cambios de la forma celular en la homeostasis de tejidos (Bui, D., *et. al.*, 2016). Esta vía se relaciona con la polaridad celular, citoesqueleto y uniones celulares (Hauri, S., *et.al.*, 2013). YAP1 se regula negativamente al unirse a 14-3-3 y se regula positivamente al interactuar con dominios PDZ a través de su PDZbm; puede ser encontrada tanto en membrana como en núcleo, y su localización en núcleo depende de su PDZbm intacto (Elbediwy, A., *et.al.*, 2018). YAP1 se encuentra en citoplasma en alta densidad celular, pero se transloca a núcleo cuando las células pierden contacto entre si (Zhao, B. *et.al.*, 2007). La unión de PATJ con YAP1 podría explicar su localización citoplásmica y nuclear, por lo que sería interesante analizar esta asociación en un futuro.

Es sabido que varias proteínas PDZ son cruciales para la retención eficiente de proteínas de membrana en células epiteliales, como canales iónicos, receptores o cinasas y que además mantienen una asociación con el citoesqueleto (Brône & Eggermont, 2005), por lo que, de acuerdo a los resultados obtenidos, PATJ podría estar implicado en la ubicación o retención de algunas proteínas de membrana en MA.

Las células inmunológicas tienen la capacidad de polarizarse rápidamente para modificar su morfología y llevar a cabo funciones específicas. Los complejos de

polaridad generan estados polarizados estables en zonas especializadas, pero también pueden dar lugar a estados polarizados transitorios como en la cicatrización de heridas o en respuestas inmunitarias (Mastrogiovanni M., *et al.*, 2022). Para analizar el comportamiento de la proteína PATJ perteneciente al complejo de polaridad CRUMBS, se llevó a cabo la estimulación de diversos PRR en MA y DC.

En la estimulación de MA y DC con LPS, éste es reconocido por el PRR TLR4 que activa una cascada de señalización al reclutar diversas moléculas adaptadoras para la producción de citocinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12) necesarias para propagar la respuesta inflamatoria y poder así eliminar al patógeno (Swanson *et al.*, 2020). Las DC al entrar en contacto con el LPS, sufren una modificación morfológica y funcional, ya que cambian a un estado de maduración que provoca un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras y en su capacidad de presentación antigénica, así como la migración a órganos linfoides secundarios (Biscari L. *et al.*, 2022).

Se encontró aquí que al estimular ambas células con LPS, PATJ tiene una tendencia a aumentar su expresión a partir de 2 horas con el estímulo (**figuras 19 y 22**) y, además, se reveló en la IF que PATJ sufre un cambio en la localización subcelular dirigido mayormente al núcleo en ambos tipos celulares (**figuras 11 y 15**), observándose más claramente que en MA se pierde la localización en lo que parece ser la membrana plasmática y hay una mayor acumulación en núcleo. Estos resultados sugieren que PATJ puede estar implicado en la vía de señalización vía TLR4, o en la maduración de las DC, quizá con mayor importancia en núcleo.

Es sabido que uno de los ligandos del complejo CRUMBS, PALS1 juega un papel importante en el sistema inmunológico adaptativo, en linfocitos T, en la activación NF-kB mediado por el TCR. La asociación que mantiene PALS1 con PATJ y Crumbs sugieren que también puedan tener importancia en la activación del mismo (Carvalho G. *et al.*, 2011). De acuerdo a estos datos, y dado que el factor NF- kB también es activado vía TLR4 en MA y DC, es probable que las proteínas del complejo CRUMBS también estén relacionadas con la activación de este factor en células del sistema inmunitario innato, MA y DC.

En DC se probó además un estímulo proinflamatorio con un coctel de maduración conformado de las citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  que median la respuesta inmunitaria innata y la producción de más citocinas proinflamatorias a través la translocación de NF- $\kappa$ B (Ott, L. W., *et.al.*, 2007, Blanco *et.al.*, 2008, Kaneko N., *et.al.*, 2019), además de la PGE<sub>2</sub> que les confiere a las DC su capacidad de migración por la regulación positiva del receptor CCR7, otro punto importante para su adecuada maduración (Karlsen M. *et. al.*, 2011, Landi A. *et. al.* ,2011). Se encontró que PATJ tiene una tendencia al aumento con este estímulo proinflamatorio (**figura 25**), además de un ligero cambio en la localización hacia el núcleo a las 24 horas (**figura 18**), por lo cual, esto podría reafirmar que PATJ quizá está implicado en el proceso de maduración de las DC, y es probable que, en este punto, PATJ también esté reclutando algunos factores de transcripción al núcleo como YAP1, de acuerdo a su principal función como proteína de andamiaje.

También se analizó la expresión de PATJ tras la estimulación de ambas células bajo estímulos fagocíticos. La estimulación con *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) H37Ra viva regula la fagocitosis mediante su reconocimiento por diversos receptores como receptores de complemento, receptores de manosa, receptores tipo C y TLR como el TLR2,4 Y 9, entre otros, (Mayer-Barber & Barber, 2015., Sia & Rengarajan, 2019), mientras que la Mtb H37Ra muerta por calor (80°C por 30 minutos, resuspendida en suero fetal bovino) regula la fagocitosis principalmente por el receptor 3 del complemento (CR3), de acuerdo a la metodología utilizada (Rosas G.,2022). CR3 es uno de los receptores del complemento más abundante en la superficie de MA y DC (Sándor N. *et al.*, 2013); el reconocimiento a través de este receptor promueve la fagocitosis, degradación y activación de cascadas de señalización que generan respuestas para eliminar al patógeno.

Al comparar los cambios de expresión de PATJ ante el mismo estímulo fagocítico, Mtb muerta por calor (HKMtb), en MA PATJ tiende a aumentar (**figura 20**) y modifica su localización subcelular para acumularse mayormente en núcleo desde los 15 minutos con el estímulo (**figura 12**), mientras que en DC parece no haber modificaciones en su expresión (**figura 23**), ya que su respuesta se mantiene muy

cercana a las condiciones basales, sin embargo, su localización subcelular se ve alterada hasta las 24 horas también con una mayor señal en núcleo; esto implicaría que PATJ podría tener un papel importante en ambas células bajo este tipo de estimulación fagocítica. Si bien, los MA se encuentran constantemente procesando las señales ambientales y son conocidos por su alta capacidad y eficiencia fagocítica de patógenos, células muertas y desechos, las DC las han descrito como fagocitos especializados en la presentación de Ag, después de exponerse a estímulos inflamatorios pierden su capacidad de absorción antigénica pero adquieren la capacidad de migración para iniciar la respuesta adaptativa (Schultze & Schmidt, 2015, Da Silva, N., & Barton, C. R. 2016, Zanoni & Granucci, 2010). Por lo que las diferencias en tiempo que se encontraron en las células, pueden deberse a la función canónica de cada una, siendo PATJ necesaria para una respuesta más rápida por MA que por las DC en la estimulación vía CR3.

La expresión de PATJ en diferentes células ante un estímulo fagocítico reconocido por diferentes receptores, como lo es con Mtb viva, genera una tendencia al aumento, aunque con diferente cinética, mientras que en MA se presenta hasta las 24 horas (**figura 21**), en DC se observa desde las 6 horas y se mantiene estable hasta las 24 horas (**figura 24**). Sin embargo, la localización en MA parece modificarse desde tiempos tempranos de 15 minutos (**figura 13**), mientras que en DC la señal de PATJ aumenta ligeramente en núcleo desde los 15 minutos, manteniéndose parecida en toda la cinética (**figura 17**). A pesar de que MA y DC tienen diversas funciones, comparten actividades como el procesamiento y presentación antigénica (Da Silva, N., & Barton, C. R. 2016), por lo que este claro aumento en la expresión de PATJ, tanto los cambios encontrados en su localización, sugieren que lleva a cabo una tarea especial en ambos tipos celulares tras la estimulación fagocítica en la que están implicados diversos receptores TLR, de manosa, tipo C, entre otros, relacionada con las funciones que comparten estas células del sistema inmunológico innato.

Se destacan algunas diferencias entre los diferentes PRR estimulados (TLR4 con estímulos proinflamatorios, CR3 con HKMtb, y TLR, receptores de manosa, tipo C

con Mtb viva). Si bien, en MA la respuesta parece similar ante los tres estímulos, parece haber un retraso de la respuesta de PATJ ante Mtb viva, en comparación con la HKMtb. Esto podría deberse quizá a mecanismos de evasión de la micobacteria en el hospedero (Pinto S. M., *et al.*, 2018,) que podría estar afectando directa o indirectamente la actividad de PATJ para favorecer su ciclo de vida. Además, el cambio en la localización subcelular encontrada con Mtb viva parece ser más marcada en comparación con la estimulación por TLR-4 o CR3, lo que sugiere que PATJ además de que puede estar implicada en las vías de reconocimiento por TLR-4 o CR3, también puede jugar un papel importante en las vías relacionadas con otros receptores necesarios para la captación y/o reconocimiento de la micobacteria, como TLR-2 y 9, receptores de manosa o tipo C.

En DC, tanto con estímulos proinflamatorios como con Mtb viva, PATJ tiende a aumentar su expresión, pero no así con el estímulo por CR3. Nuestros resultados muestran la expresión de PATJ también en las dendritas, sin embargo, con la estimulación con Mtb viva se observan mayor cantidad de dendritas en las DC en comparación con el estímulo con HKMtb. En células epiteliales se ha visto que el complejo CRUMBS es importante para la generación de los cilios, en los que es necesario reorganizar el citoesqueleto de actina (Bazellières E., *et al.*, 2017). En la maduración de la DC, la formación de dendritas es un proceso importante. La proteína PDZ PDLIM4 es vital para la generación de la respuesta inmunológica en DC y su correcta maduración, pues está relacionada con la formación de las dendritas al interactuar con el citoesqueleto de actina a través de su dominio PDZ; estas dendritas son importantes para la correcta formación de la sinapsis inmunológica (SI) (Yoo J. Y., *et al.*, 2019).

Nuestros resultados sugieren que PATJ también puede estar implicado en la correcta formación de la SI ya que parece ser importante en el proceso de maduración de la DC, y en la formación de las dendritas, aunque su participación en estos procesos puede deberse al tipo de receptor por el cual está siendo estimulada la célula, por lo cual, sería interesante analizar en un futuro si es que PATJ está realmente relacionada con estos procesos.

Una característica destacable de las proteínas PDZ es que son promiscuas (Gerek Z. N., *et.al.*, 2009) y, recordemos que PATJ contiene múltiples dominios PDZ, por lo que puede unirse a diferentes ligandos. La localización diferencial encontrada entre MA y DC puede indicar que PATJ se une a diferentes ligandos en cada estirpe celular por lo que podría ejercer funciones distintas en cada una de estas células. Estudios futuros permitirán evaluar la función y asociación de PATJ de acuerdo a las diferentes localizaciones subcelulares encontradas.

Todos estos datos sugieren que PATJ es importante en MA y DC desde su presencia en condiciones basales, y también para la generación de una respuesta en estas células inmunitarias innatas a través de la estimulación de sus PRR, sin embargo, es necesario aumentar el tamaño de muestra en cada uno de los experimentos realizados, para determinar si esta tendencia al aumento encontrada es realmente significativa, pues al trabajar con células de población humana abierta, la variabilidad que se observa es muy amplia.



## **11. Conclusiones**

La proteína PATJ se expresa en MA y DC derivadas de Mo, pero muestra patrones de localización distintos, por lo que puede estar implicada en funciones diferentes en cada célula.

La localización novedosa de PATJ sugiere que lleva a cabo un papel importante en el núcleo de MA y DC que puede estar relacionado con la vía Hippo y el factor NF- $\kappa$ B.

PATJ modula su expresión con tendencia al aumento ante la estimulación de diversos PRR en MA y DC, lo que sugiere su importancia en la respuesta inmunitaria innata.

## **12. Perspectivas**

Debido a que este trabajo se realizó a partir de población humana abierta, existe una alta probabilidad de obtener una extensa variabilidad en los datos obtenidos, por ello, es necesario analizar un mayor número de individuos para obtener datos más robustos que permitan determinar si realmente existe una diferencia significativa en los cambios encontrados sobre la proteína PATJ en macrófagos y células dendríticas bajo estímulos PRR dependientes, y poder así concluir de una manera más acertada a partir de los resultados. Además de analizar la función que está llevando a cabo PATJ dentro del núcleo de los macrófagos y células dendríticas bajo los estímulos PRR dependientes utilizados en este estudio, que sugieren una relación con el factor de transcripción NF- $\kappa$ B y la vía Hippo.

Asimismo, completar la investigación de PATJ y otras proteínas PDZ en células inmunológicas adicionales como en linfocitos y monocitos, entre otras, para dilucidar su función, diferencias o similitudes entre ellas en la respuesta inmunitaria.

### 13. Apéndice I: Disoluciones

➤ Disolución salina de fosfatos (PBS) 1x (1L) pH 7.4

- NaCl 137mM (8.0g)
- KCl 2.7mM (0.2g)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM (1.44g)
- KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.8mM (0.24g)

➤ Disolución de lisis de eritrocitos (1L)

- NaHCO<sub>3</sub> 10mM (0.84g)
- NH<sub>4</sub>Cl 150mM (8.02g)
- EDTA 0.1mM (0.029g)

➤ Disolución de Miltenyi (200mL)

- EDTA 2Mm (0.12g)
- SFB 0.5% (1mL)
- PBS 1x c.b.p. 200mL

➤ Disolución de electroforesis (1L) pH 8.3

- Tris 25Mm (3.03g)
- Glicina 200Mm (15.01g)
- SDS 1% (1.0g)

➤ Disolución de transferencia 1x (1L)

- Tris 25mM (3.03g)
- Glicina 200 mM (15.01g)
- MeOH 20% (200mL)

➤ Disolución salina tamponada con TRIS (TBS) 1x (1L) pH 7.6

- TRIS base 20mM (2.4g)
- NaCl 150mM (8.8g)

➤ Disolución de lavado WB (1L)

- TBS 1x 1L
- Tween 0.1% (1 mL)

➤ Disolución de lavado IF (200mL)

- ASB 1% (2g)
- Tritón x-100 0.1% (100µL)
- PBS 1x c.b.p 200mL

## 14. Bibliografía

1. Abbas, A. K. (2020). *Inmunología básica* 6 ed. © 2020 (6.a ed.). Elsevier España, S.L.U.
2. Alfaro, C., Oñate, C., Rodríguez, A., Pérez-Gracia, J.L., Fernández de Sanmamed, M., & Melero, I. (2013). Células dendríticas especializadas en presentación de antígenos exógenos a linfocitos T citotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 36(3), 519-537. <https://dx.doi.org/10.4321/S1137-66272013000300016>
3. Assémat, E., Bazellières, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A., & Massey-Harroche, D. (2008). Polarity complex proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(3), 614-630. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.029>
4. Barreda, D., Gutiérrez-González, L. H., Martínez-Cordero, E., Cabello-Gutiérrez, C., Chacón-Salinas, R., & Santos-Mendoza, T. (2020). The Scribble Complex PDZ Proteins in Immune Cell Polarities. *Journal of immunology research*, 2020, 5649790. <https://doi.org/10.1155/2020/5649790>
5. Barreda, D., Ramón-Luing, L. A., Duran-Luis, O., Bobadilla, K., Chacón-Salinas, R., & Santos-Mendoza, T. (2020). Scrib and Dlg1 polarity proteins regulate Ag presentation in human dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 108(3), 883-893. <https://doi.org/10.1002/jlb.4ma0320-544rr>
6. Baruch Z. Harris, Wendell A. Lim; Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* 15 September 2001; 114 (18): 3219–3231. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.114.18.3219>
7. Biscari, L., Kaufman, C. D., Farré, C., Huhn, V., Pacini, M. F., Balbi, C. B., Gómez, K. A., Pérez, A. R., & Alloatti, A. (2022). Immunization With Lipopolysaccharide-Activated Dendritic Cells Generates a Specific CD8+ T Cell Response That Confers Partial Protection Against Infection With *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.897133>
8. Blanco, P., Palucka, K., Pascual, V., & Banchereau, J. (2008e). Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 19(1), 41-52. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.10.004>
9. Brône, B., & Eggermont, J. (2005). PDZ proteins retain and regulate membrane transporters in polarized epithelial cell membranes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 288(1), C20-C29. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00368.2004>
10. Bui, D. A., Lee, W., White, A. E., Harper, J. W., Schackmann, R. C. J., Overholtzer, M., Selfors, L. M., & Brugge, J. S. (2016). Cytokinesis involves a nontranscriptional function of the Hippo pathway effector YAP. *Science Signaling*, 9(417). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa9227>
11. Caillet-Saguy, C., Maisonneuve, P., Delhommel, F., Terrien, E., Babault, N., Lafon, M., Cordier, F., & Wolff, N. (2015). Strategies to interfere with PDZ-mediated interactions in neurons: What we can learn from the rabies virus. *Progress in biophysics and molecular biology*, 119(1), 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.007>
12. Carvalho, G., Poalas, K., Demian, C., Hatchi, E., Vazquez, A., & Bidère, N. (2011). Participation of the Cell Polarity Protein PALS1 to T-Cell Receptor-Mediated NF-κB Activation. *PLoS ONE*, 6(3), e18159. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018159>
13. Chai, J., Cai, Y., Pang, C., Wang, L., McSweeney, S., Shanklin, J., & Liu, Q. (2021). Structural basis for SARS-CoV-2 envelope protein recognition of human cell junction

- protein PALS1. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23533-x>
14. Christensen, N. R., Čalyševa, J., Fernandes, E., Lüchow, S., Clemmensen, L. S., Haugaard-Kedström, L. M., & Strømgaard, K. (2019). PDZ Domains as Drug Targets. *Advanced therapeutics*, 2(7), 1800143. <https://doi.org/10.1002/adtp.201800143>
  15. Clark, G. J., Silveira, P. A., Hogarth, P. M., & Hart, D. N. (2019). The cell surface phenotype of human dendritic cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 86, 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2018.02.013>
  16. Collin, M., & Bigley, V. (2018). Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*, 154(1), 3–20. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1111/imm.12888>
  17. Da Silva, N., & Barton, C. R. (2016). Macrophages and dendritic cells in the post-testicular environment. *Cell and tissue research*, 363(1), 97–104. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s00441-015-2270-0>
  18. Database, G. H. G. (s. f.). PATJ Gene - GeneCards | INADL Protein | INADL Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PATJ>
  19. Deevi, R. K., Cox, O. T., & O'Connor, R. (2014). Essential Function for PDLIM2 in Cell Polarization in Three-Dimensional Cultures by Feedback Regulation of the  $\beta$ 1-Integrin–RhoA Signaling Axis. *Neoplasia*, 16(5), 422-431. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.04.006>
  20. Duning, K., Schurek, E. M., Schlüter, M., Bayer, M., Reinhardt, H. C., Schwab, A., Schaefer, L., Benzing, T., Schermer, B., Saleem, M. A., Huber, T. B., Bachmann, S., Kremerskothen, J., Weide, T., & Pavenstädt, H. (2008). KIBRA modulates directional migration of podocytes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 19(10), 1891–1903. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007080916>
  21. Elbediwy, A., Vanyai, H., Diaz-de-la-Loza, M. D. C., Frith, D., Snijders, A. P., & Thompson, B. J. (2018). Enigma proteins regulate YAP mechanotransduction. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.221788>
  22. Gallego-Gutiérrez, H., González-González, L., Ramírez-Martínez, L., López-Bayghen, E., & González-Mariscal, L. (2021). Tight junction protein ZO-2 modulates the nuclear accumulation of transcription factor TEAD. *Molecular biology of the cell*, 32(15), 1347–1358. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1091/mbc.E20-07-0470>
  23. Gardiol D. (2012). PDZ-containing proteins as targets in human pathologies. *The FEBS journal*, 279(19), 3529. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1111/j.1742-4658.2012.08685.x>
  24. Gerek, Z. N., Keskin, O., & Ozkan, S. B. (2009). Identification of specificity and promiscuity of PDZ domain interactions through their dynamic behavior. *Proteins*, 77(4), 796–811. <https://doi.org/10.1002/prot.22492>
  25. Gutiérrez-González, L. H., & Santos-Mendoza, T. (2019). Viral targeting of PDZ polarity proteins in the immune system as a potential evasion mechanism. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(10), 10607–10617. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1096/fj.201900518R>
  26. Hata, Y., Nakanishi, H., & Takai, Y. (1998). Synaptic PDZ domain-containing proteins. *Neuroscience Research*, 32(1), 1-7. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(98\)00069-8](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(98)00069-8)
  27. Hauri, S., Wepf, A., Drogen, A., Varjosalo, M., Tapon, N., Aebersold, R., & Gstaiger, M. (2013). Interaction proteome of human Hippo signaling: modular

- control of the co-activator YAP 1. *Molecular Systems Biology*, 9(1), 713. <https://doi.org/10.1002/msb.201304750>
28. Hoffer, L., Roche, P., Morelli, X. (2021). Rational Design of PDZ Domain Inhibitors: Discovery of Small Organic Compounds Targeting PDZ Domains. In: Borg, JP. (eds) PDZ Mediated Interactions. *Methods in Molecular Biology*, vol 2256. Humana, New York, NY. [https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-1-0716-1166-1\\_16](https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-1-0716-1166-1_16)
  29. Holcomb, J., Spellmon, N., Trescott, L., Sun, F., Li, C., & Yang, Z. (2015). PDZ Structure and Implication in Selective Drug Design against Cystic Fibrosis. *Current Drug Targets*, 16(9), 945-950. <https://doi.org/10.2174/1389450116666141219120125>
  30. James, C. D., & Roberts, S. (2016). Viral Interactions with PDZ Domain-Containing Proteins-An Oncogenic Trait?. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 5(1), 8. <https://doi.org/10.3390/pathogens5010008>
  31. Kaneko, N., Kurata, M., Yamamoto, T., Morikawa, S., & Masumoto, J. (2019c). The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflammation and Regeneration*, 39(1). <https://doi.org/10.1186/s41232-019-0101-5>
  32. Karlsen, M., Hovden, A., Vogelsang, P., Tysnes, B. B., & Appel, S. (2011). Bromelain Treatment Leads to Maturation of Monocyte-derived Dendritic Cells but Cannot Replace PGE2 in a Cocktail of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and PGE2. *Scandinavian Journal of Immunology*, 74(2), 135-143. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2011.02562.x>
  33. Kawai, T., & Akira, S. (2007). TLR signaling. *Seminars in Immunology*, 19(1), 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.12.004>
  34. Kim, J. Y., Song, J. Y., Karnam, S., Park, J. Y., Lee, J. J., Kim, S., & Cho, S. H. (2015). Common and distinctive localization patterns of Crumbs polarity complex proteins in the mammalian eye. *Gene Expression Patterns*, 17(1), 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2015.01.002>
  35. Landi, A., Babiuk, L. A., & Van Drunen Littel-Van Den Hurk, S. (2011b). Dendritic cells matured by a prostaglandin E2-containing cocktail can produce high levels of IL-12p70 and are more mature and Th1-biased than dendritic cells treated with TNF- $\alpha$  or LPS. *Immunobiology*, 216(6), 649-662. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.11.004>
  36. Lemmers, C., Médina, E., Delgrossi, M. H., Michel, D., Arsanto, J. P., & Le Bivic, A. (2002). hINAD1/PATJ, a Homolog of Discs Lost, Interacts with Crumbs and Localizes to Tight Junctions in Human Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25408-25415. <https://doi.org/10.1074/jbc.m202196200>
  37. Liu, X., & Fuentes, E. J. (2019). Emerging Themes in PDZ Domain Signaling. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 129-218. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.013>
  38. Long, J., Wei, Z., Feng, W., Yu, C., Zhao, Y., & Zhang, M. (2008). Supramodular Nature of GRIP1 Revealed by the Structure of Its PDZ12 Tandem in Complex with the Carboxyl Tail of Frs1. *Journal of Molecular Biology*, 375(5), 1457-1468. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.11.088>
  39. Ludford-Menting, M. J., Oliaro, J., Sacirbegovic, F., Cheah, E. T., Pedersen, N., Thomas, S. J., Pasam, A., Iazzolino, R., Dow, L. E., Waterhouse, N. J., Murphy, A., Ellis, S., Smyth, M. J., Kershaw, M. H., Darcy, P. K., Humbert, P. O., & Russell, S. M. (2005). A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation. *Immunity*, 22(6), 737-748. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.immuni.2005.04.009>

40. Manjunath, G. P., Ramanujam, P. L., & Galande, S. (2017). Structure function relations in PDZ-domain-containing proteins: Implications for protein networks in cellular signalling. *Journal of Biosciences*, 43(1), 155–171. <https://doi.org/10.1007/s12038-017-9727-0>
41. Mastrogiovanni, M., Di Bartolo, V., & Alcover, A. (2022). Cell polarity regulators, multifunctional organizers of lymphocyte activation and function. *Biomedical Journal*, 45(2), 299-309. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2021.10.002>
42. 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>
43. Médina, E., Lemmers, C., Lane-Guermonprez, L. and Le Bivic, A. (2002), Role of the Crumbs complex in the regulation of junction formation in Drosophila and mammalian epithelial cells. *Biology of the Cell*, 94: 305-313. [https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/S0248-4900\(02\)00004-7](https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/S0248-4900(02)00004-7)
44. Mukherjee, S., Karmakar, S., & Babu, S. P. S. (2016). TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20(2), 193-204. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.10.011>
45. Nourry, C., Grant, S. G., & Borg, J. P. (2003). PDZ domain proteins: plug and play!. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2003(179), RE7. <https://doi.org/10.1126/stke.2003.179.re7>
46. Ott, L. W., Resing, K. A., Sizemore, A. W., Heyen, J. W., Cocklin, R. R., Pedrick, N. M., Woods, H. C., Chen, J. Y., Goebel, M. G., Witzmann, F. A., & Harrington, M. A. (2007). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ - and interleukin-1-induced cellular responses: coupling proteomic and genomic information. *Journal of proteome research*, 6(6), 2176–2185. <https://doi.org/10.1021/pr060665l>
47. Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, 357(9270), 1777-1789. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)04904-7)
48. Pinto, S. M., Verma, R., Advani, J., Chatterjee, O., Patil, A. H., Kapoor, S., Subbannayya, Y., Raja, R., Gandotra, S., & Prasad, T. S. K. (2018). Integrated Multi-Omic Analysis of Mycobacterium tuberculosis H37Ra Redefines Virulence Attributes. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01314>
49. Roh, M. H., Makarova, O., Liu, C. J., Shin, K., Lee, S., Laurinec, S., Goyal, M., Wiggins, R., & Margolis, B. (2002). The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *The Journal of cell biology*, 157(1), 161–172. <https://doi.org/10.1083/jcb.200109010>
50. Rosas-García, J., Ramón-Luing, L. A., Bobadilla, K., Meraz-Ríos, M. A., Sevilla-Reyes, E. E., & Santos-Mendoza, T. (2022). Distinct Transcriptional Profile of PDZ Genes after Activation of Human Macrophages and Dendritic Cells. *International journal of molecular sciences*, 23(13), 7010. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3390/ijms23137010>
51. Rouaud, F., Sluysmans, S., Flinois, A., Shah, J., Vasileva, E., & Citi, S. (2020). Scaffolding proteins of vertebrate apical junctions: structure, functions and biophysics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(10), 183399. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183399>
52. Ruffner, M. A., Song, L., Maurer, K., Shi, L., Carroll, M. C., Wang, J. X., Muir, A. B., Spergel, J. M., & Sullivan, K. E. (2019). Toll-like receptor 2 stimulation augments esophageal barrier integrity. *Allergy*, 74(12), 2449–2460. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1111/all.13968>

53. Sándor, N., Kristóf, K., Paréj, K., Pap, D., Erdei, A., & Bajtay, Z. (2013). CR3 is the dominant phagocytotic complement receptor on human dendritic cells. *Immunobiology*, 218(4), 652-663. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.07.031>
54. Sattler, S. (2017). The role of the immune system beyond the fight against infection. En Springer eBooks (pp. 3-14). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-57613-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-57613-8_1)
55. Schultze, J. L., & Schmidt, S. (2015). Molecular features of macrophage activation. *Seminars in Immunology*, 27(6), 416-423. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.009>
56. Shamaei, M., & Mirsaeidi, M. (2021). Nontuberculous Mycobacteria, Macrophages, and Host Innate Immune Response. *Infection and immunity*, 89(8), e0081220. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1128/IAI.00812-20>
57. Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6425-6440. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>
58. Sia, J. K., & Rengarajan, J. (2019). Immunology of Mycobacterium tuberculosis Infections. *Microbiology Spectrum*, 7(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0022-2018>
59. Storrs, C. H., & Silverstein, S. J. (2007). PATJ, a Tight Junction-Associated PDZ Protein, Is a Novel Degradation Target of High-Risk Human Papillomavirus E6 and the Alternatively Spliced Isoform 18 E6\*. *Journal of Virology*, 81(8), 4080-4090. <https://doi.org/10.1128/jvi.02545-06>
60. Sousa, C. R. E. (2004). Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Current Opinion in Immunology*, 16(1), 21-25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.11.007>
61. Swanson, L., Katkar, G. D., Tam, J. S., Pranadinata, R. F., Chareddy, Y., Coates, J., Anandachar, M. S., Castillo, V., Olson, J., Nizet, V., Kufareva, I., Das, S., & Ghosh, P. (2020). TLR4 signaling and macrophage inflammatory responses are dampened by GIV/Girdin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(43), 26895-26906. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011667117>
62. Takeda, K., & Akira, S. (2015). Toll-Like Receptors. *Current Protocols in Immunology*, 109(1). <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1412s109>
63. Tomar, N., & De, R. K. (2014). A brief outline of the immune system. En Springer eBooks (pp. 3-12). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1115-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1115-8_1)
64. UniProt. (s. f.). <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8NI35/entry>
65. van Ham, M., & Hendriks, W. (2003). PDZ domains-glue and guide. *Molecular biology reports*, 30(2), 69–82. <https://doi.org/10.1023/a:1023941703493>
66. Varol, C., Mildner, A., & Jung, S. (2015). Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 643-675. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112220>
67. Vázquez, M. B., Sureda, M., & Rebollo, J. (2012). Células dendríticas I: aspectos básicos de su biología y funciones. *Inmunología*, 31(1), 21-30. <https://doi.org/10.1016/j.inmuno.2011.10.001>
68. Wang, W. J., Lyu, T. J., & Li, Z. (2021). Research Progress on PATJ and Underlying Mechanisms Associated with Functional Outcomes After Stroke. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, Volume 17, 2811-2818. <https://doi.org/10.2147/ndt.s310764>
69. Wells, C. D., Fawcett, J. P., Traweger, A., Yamanaka, Y., Goudreault, M., Elder, K., Kulkarni, S., Gish, G., Virag, C., Lim, C., Colwill, K., Starostine, A., Metalnikov, P., &



- Pawson, T. (2006). A Rich1/Amot Complex Regulates the Cdc42 GTPase and Apical-Polarity Proteins in Epithelial Cells. *Cell*, 125(3), 535-548. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.045>
70. Yoo, J. Y., Jung, N., Lee, J., Choi, S., Choi, H., Park, S., Jang, J., Byun, S., Hwang, S., Noh, K., Park, Y., Lee, J., Song, J., Seo, H. G., Lee, H., & Lee, J. H. (2019). Pdlim4 is essential for CCR7-JNK-mediated dendritic cell migration and F-actin-related dendrite formation. *The FASEB Journal*, 33(10), 11035-11044. <https://doi.org/10.1096/fj.201901031>
71. Yu, Y., Li, S., Wang, K., & Wan, X. (2019). A PDZ Protein MDA-9/Syntenin: As a Target for Cancer Therapy. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 136-141. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.01.002>
72. Zanna, M. Y., Yasmin, A. R., Omar, A. R., Arshad, S. S., Mariatulqabtiah, A. R., Nur-Fazila, S. H., & Mahiza, M. I. N. (2021). Review of Dendritic Cells, Their Role in Clinical Immunology, and Distribution in Various Animal Species. *International journal of molecular sciences*, 22(15), 8044. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3390/ijms22158044>
73. Zanoni, I., & Granucci, F. (2010b). Differences in lipopolysaccharide-induced signaling between conventional dendritic cells and macrophages. *Immunobiology*, 215(9-10), 709-712. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.05.026>
74. Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z. C., & Guan, K. L. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & Development*, 21(21), 2747-2761. <https://doi.org/10.1101/gad.1602907>
75. 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.pbidi.unam.mx:2443/10.1038/ncb3413>