



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Estandarización de técnicas para detección de la expresión de
Lrba (LipopolysaccharideResponsive Beige-like Anchor protein)
en linfocitos B murinos.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:
DANIELA PÉREZ PÉREZ

ASESORA: DRA. GABRIELA LÓPEZ HERRERA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Tesis y Examen Profesional**

Estandarización de técnicas para detección de la expresión de Lrba (*Lipopolysaccharide Responsive Beige-like Anchor protein*) en linfocitos B murinos.

Que presenta la pasante: **Daniela Pérez Pérez**

Con número de cuenta: **308145928** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de Mayo de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M en C. Idalia Carmen Avila Miyazawa	
VOCAL	M. en C. Marina Lucía Morales Galicia	
SECRETARIO	Dra. Gabriela López Herrera	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	
2do. SUPLENTE	Dr. Salvador Fonseca Coronado	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/cga*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres Sara y Daniel por el amor y apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida, por siempre acompañarme y darme siempre palabras de aliento cuando más las necesité, pero sobre todo por dejarme luchar por mis sueños. No preciso las palabras para expresar el amor que les tengo, no pude tener mejor suerte al tenerlos como papás.

A mi hermanita Erika que la quiero con todo mi corazón, porque no solo es familia, es mi amiga y por la única persona que me gustaría ser un buen ejemplo. Sabes que siempre quiero lo mejor para ti y que estoy muy orgullosa de ti, aunque a veces no pensemos de la misma forma. Te adoro chango.

Gracias a mi tía Adriana, porque siempre se ha interesado por mi bienestar y el de mi hermana. Eres mi tía favorita y no sólo eso, eres una de las personas más nobles que he conocido y nunca olvido que siempre has estado presente en los momentos más importantes (buenos y malos). Te quiero muchísimo.

A mi Maic, ¿qué te puedo decir y que no lo sepas ya? Nunca dejas de darme lecciones, eres una persona tan genial e importante para mí, que es asombroso verte feliz. Te quiero bien recio, gracias por ser, gracias por estar.

Gracias a mi Ale boy por ser mi amiga, por escucharme y apapacharme. Sin ti creo que me habría vuelto loca en esta aventura, además no sólo fuimos compañeras de clase, fuimos (somos) compañeras de tocho, compañeras de cuarto, compañeras de patoaventuras (literal), ¡compañeras de vida! Te quiero, morro.

Gracias a mi Serch por darme su amistad desde que tengo memoria y porque a pesar de que pasen los años, sé que nos tenemos el uno al otro, aunque finjas que no me quieres.

No puedo agradecer a uno por uno, porque sería otra tesis de agradecimientos, pero gracias al RDGMABAYNBPF crew, a Juan Carlos, gracias a mis tocheritas y a mi coach Ceci por hacerme ver la vida de otra forma, por su cariño y por echarme porras incluso cuando yo llegara a dudar de mí.

Gracias a Jime y a Chris por ayudarme en el laboratorio y por hacerme pasar tan buenos momentos entre incubación e incubación. Fue genial conocerlas y compartir tantas horas de trabajo. Gracias también a Susy, Pame, Selma, Belén, Monse, Dany y David por ser tan buenos compañeros.

También quiero agradecer a una persona que me ayudó, que estuvo en momentos muy importantes de mi carrera y que me apoyó moral y físicamente en la realización de este trabajo. Gracias por eso.

Quiero agradecer a mis profesoras de CCH Amada Margarita Velázquez de la Mota, Leticia Ortega Montes y María de Lourdes Romero Martínez porque no sólo ayudaron a mi formación académica, también me hicieron dar cuenta de lo que quería ser de grande. Gracias a mis profesores de la FES Cuautitlán Enrique Ramón Ángeles Anguiano, María Esther Revuelta Miranda, Ricardo Santiago Díaz, Ángel Germán Martínez Sosa, María de Lourdes Galván Ruíz, Brígida del Carmen Camacho Enríquez, Lucero Paniagua García e Idalia Carmen Ávila Miyazawa por reafirmar el amor que le tengo a mi Universidad y a mi carrera.

Gracias a la Dra. Liliana Carmona Aparicio por todas sus enseñanzas, paciencia y calidad humana con la que fui recibida en el INP. Gracias a la Dra. Laura Berrón Ruíz por apoyarme en mi trabajo de laboratorio y por sus enseñanzas.

Gracias a la Dra. Gabriela López Herrera en primer lugar por aceptar dirigir mi trabajo de tesis. Hizo un excelente trabajo conmigo porque conoce y entiende las necesidades de un alumno, pues me proporcionó las herramientas necesarias para que éste proyecto saliera adelante aún con los obstáculos que se presentaron. Gracias por ser paciente conmigo y preocuparse de mi situación académica y profesional. Aún nos queda un proyecto juntas, en el cual espero seguir contando con su apoyo el cual sabré corresponder. Considero que es una persona digna de admiración y un gran ejemplo a seguir, por lo que estoy muy orgullosa de ser su alumna.

Gracias a Dios por permitirme estar con todas las personas que he mencionado y por tener la fortuna que me acompañen en éste momento tan importante en mi vida académica y personal.

Gracias a la UNAM, porque es mi segunda casa y estoy infinitamente orgullosa de pertenecer a su comunidad. Formar parte de la máxima casa de estudios es algo por lo que siempre tendré la frente en alto, es aquí donde conocí a las personas que más quiero, un recinto en el que he sido libre de explotar todo mi potencial, un lugar en el que no puedo evitar que mi piel se ponga chinita cada vez que canto un Goya y digo...

“Por mi raza hablará el espíritu”

Esta tesis está dedicada a mi familia, a la UNAM y a mi país, México.



Instituto
Nacional
de Pediatría

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en
Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría, bajo la dirección de la
Dra. Gabriela López Herrera y financiado con recursos del proyecto CONACyT
CB-154472.

ÍNDICE

Abreviaturas	viii
Índice de figuras	x
Índice de cuadros	xi
Índice de gráficos	xi
Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico	
1. Sistema inmune	2
1.1. Inmunidad innata	3
1.2. Inmunidad adaptativa	4
1.2.1. Órganos linfáticos	5
1.2.1.2. Bazo	5
1.2.2. Linfocitos T	7
1.2.3. Linfocitos B	8
1.2.3.1. Estructura de anticuerpos y BCR	12
1.2.3.2. Desarrollo de linfocitos B	15
1.2.3.3. Activación de linfocitos B	19
2. Lrba (Lipopolysaccharide responsive beige-like anchor protein)	21
2.1. Estructura de Lrba	22
2.1.1. Parálogos	25
2.1.2. Ortólogos	26
2.2. Ubicación celular	28
2.2.2. Mecanismos de acción propuestos	29
2.3. Importancia clínica de LRBA	32
Justificación	36
Objetivos	36
Hipótesis	37
Procedimiento experimental	37
Diagrama de flujo	46
Resultados	47
Discusión de resultados	61
Conclusiones	68
Perpectivas	69
Referencias	69
Anexo 1: Fundamentos de las técnicas utilizadas	74
Anexo 2: Características de los anticuerpos Anti-LRBA humano utilizados	78
Anexo 3: Procedimiento experimental realizado en muestras provenientes de humanos	78

Abreviaturas

aa.- Aminoácido

AKAP.- Proteína de anclaje a cinasa dependiente de AMPc

AMPc.- Adenosín monofosfato-3',5' cíclico

APC.- Células presentadoras de antígeno

APRIL.- Ligando A inductor de proliferación

BAFF.- Factor activador de células B

BCDP.- Proteína que contiene el dominio BEACH

BCR.- Receptor de célula B

BW-GFP.- Proteína verde fluorescente BEACH y WD

CD.- Drupo de diferenciación

cDNA.- DNA complementario

CDR.- Región determinante de complementaridad

Célula NK.- Célula Natural killer.

Célula Tc.- Célula T citotóxica.

Célula Th.- Célula T cooperadora o T helper.

Célula Treg.- Célula T reguladora.

CLP.- Progenitor común linfoide.

CSR.- Recombinación de cambio de clase

CTLA-4.- Antígeno 4 de linfocito T citotóxico

CVID.- Inmunodeficiencia común variable

DC.- Célula dendrítica.

DMEM.- Medio modificado de Dulbecco Eagle.

DNA.- Ácido desoxirribonucleico.

Dominio BEACH.- Beige y Chediak-Higashi

Dominio ConA-like.- Unión a lectina tipo concavalina A

Dominio PH.- Tipo homología a plekstrina.

Dominio VHS.- VPS (clasificación de proteínas vacuolares)-27, Hrs (sustrato de tirosin cinasa regulado por el factor de crecimiento de hepatocitos) domain and STAM (molécula adaptadora de transducción de señales)

dsRNA.- RNA de doble cadena.

EDTA.- Ácido etilendiaminotetraacético

EPO.- Eritropoyetina.

et al. .- y colaboradores.

Fab.- Fragmento de union al antígeno.

Fc.- Fragmento cristalizable.

FOXP3.- Forkhead box P3.

GALT.- Tejido linfático asociado al intestino.

GC.- Centros germinales.

GM-CSF.- Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.

HRP.- Peroxidasa de rábano.

HVR.- Región de hipervariabilidad.

Ig.- Inmunoglobulina.

IL.- Interleucina.

IMF.- Intensidad media de fluorescencia.

IFN- γ .- Interferón gamma.

Iso.- Isotipo

LC3.- Cadena ligera 3.

LIR.- Región de interacción con LC3.

LPS.- Lipopolisacárido
LRBA.- Lipopolysaccharide responsive beige-like anchor protein humana.
Lrba.- Lipopolysaccharide responsive beige-like anchor protein murina.
LRBA.- Lipopolysaccharide responsive beige-like anchor gen humano.
Lrba.- Lipopolysaccharide responsive beige-like anchor gen murino.
LYST.- Regulador de tráfico vesicular.
MALT.- Tejido linfático asociado a mucosas
MHC.- Complejo principal de histocompatibilidad.
mL.- Mililitro
 μ L.- Microlitro
 μ M.- Micromolar
mRNA.- RNA mensajero.
NBEA.- Neurobeachina.
NBEAL.- Proteína tipo neurobeachina.
NF- κ B.- Factor nuclear intensificadorde cadena ligera kappa de células B.
NSMAF.- Factor asociado a la activación de esfingomielinasa neutral.
MZ.- Zona marginal.
PALS.- Vaina periarteriolar linfática.
PAMPs.- Patrones moleculares asociados a patógenos.
PBS.- Buffer salino de fosfatos.
pH.- Potencial de Hidrógeno.
PID.- Inmunodeficiencia primaria
PKA.- Protein cinasa dependiente de AMPc
PNA.- Aglutinina de cacahuete
PRRs.- Receptores de reconocimiento de patrones.
PVDF.- polifluoruro de vinilideno
Rag.- Genes activadores de recombinación.
Repetidos WD40.- Repetidos que contienen Triptófano (W) y Ácido aspártico (D).
RPMI.- Medio Roswell Park Memorial Institute.
RNA.- Ácido ribonucleico.
SCF.- Factor de células troncales.
TCR.- Receptor de célula T.
TD.- Dependiente de células T
TdT.- Desoxinucleotidil transferase terminal.
TGF- β .- Factor de crecimiento tumoral beta.
THPO.- Trombopoyetina.
TI.- Independiente de células T
TLR.- Receptor tipo Toll.
TNF.- Factor de necrosis tumoral.
Tris-HCl.- tris(hidroximetil)aminometano-ácido clorhídrico
WDFY.- Proteína que contiene dominio de zinc 5 y repetidos WD.
WDR81.- Dominio 81 de repetidos WD.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la estructura histológica del bazo	6
Figura 2. Tinción de Wright de linfocitos.	9
Figura 3. Función de las subpoblaciones de linfocitos B.	12
Figura 4. Estructura de IgG	13
Figura 5. Estructura de BCR	14
Figura 6. Desarrollo de linfocitos B y fenotipo de sus componentes	17
Figura 7. Estructura proteica de Lrba.	22
Figura 8. La expresion de <i>lrba</i> es inducible en células B y macrófagos.	23
Figura 9. Representación esquemática de las BDCPs	26
Figura 10. Estructura de Lrba y sus ortólogos	27
Figura 11. Localización celular de la proteína BW-GFP en macrófagos RAW 267.4	29
Figura 12. Modelo de secreción vesicular utilizando Lrba como prototipo	30
Figura 13. Modelo de interacción entre BDCPs utilizando LYST yWDFY3 como prototipo	31
Figura 14. Representación esquemática de LRBA y algunas variantes genéticas	35
Figura 15. Diseño de panel de citometría de flujo para detección de Lrba en las subpoblaciones de linfocitos B murinos	44
Figura 16. Localización de las secuencias reconocidas por los anticuerpos utilizados (inmunógenos)	50
Figura 17. Western blot de Lrba en órganos de ratón.	51
Figura 18. Citometría de flujo con la tinción inicial	52
Figura 19. Microscopía confocal con la tinción inicial	53
Figura 20. Histogramas de tinción final en citometría de flujo	54
Figura 21. Utilización de PNA como marcador de activación	55
Figura 22. Mejoras realizadas a la técnica de microscopía confocal.	58
Figura 23. Tinción final para microscopía confocal	59
Figura 24. LRBA en fibroblastos humanos por microscopía confocal	60
Figura 25. Principio general de citometría de flujo	74
Figura 26. Principio general de Western blot	76
Figura 27. Principio general de microscopia confocal	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Componentes del sistema inmune innato	3
Cuadro 2. Subpoblaciones de linfocitos T	7
Cuadro 3. Proteínas pertenecientes a la familia BDCP	25
Cuadro 4. Distribución de las principales inmunodeficiencias primarias	32
Cuadro 5. Genes asociados a CVID.	33
Cuadro 6. Características de los anticuerpos Anti-LRBA humano utilizados	78

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Porcentaje de homología entre los inmunógenos de LRBA y Lrba reconocidos por los anticuerpos utilizados	47
Gráfico 2. Resultados estadísticos de detección de Lrba con la tinción inicial.	53
Gráfico 3. Expresión de Lrba en linfocitos B murinos cultivados 48 horas	56
Gráfico 4. Expresión de LRBA en linfocitos B humanos testigo	60

RESUMEN

Lrba (Lipopolysaccharide responsive beige-like anchor protein) es una proteína intracelular que se encuentra de manera ubicua en el organismo, con elevación en linfocitos B y macrófagos al ser activados con LPS bacteriano. Aunque se desconoce su mecanismo de acción, se asocia con el tráfico vesicular celular y la mutación de los genes que la codifican pueden provocar inmunodeficiencia común variable. El estudio de la función de Lrba es limitado dada la carencia de anticuerpos dirigidos contra la proteína de ratón, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar si los anticuerpos dirigidos contra Lrba en humanos pueden ser utilizados para estudiar esta proteína en células de ratón. En el presente trabajo se exponen el desarrollo de tres técnicas para validar el uso de anticuerpos dirigidos contra LRBA humana en un modelo de ratón *in vitro*. Las técnicas en las que se utilizaron estos anticuerpos fueron: Western blot, citometría de flujo y microscopía confocal; los anticuerpos utilizados consistieron en ab121601 y ab121765. Los resultados obtenidos indican que el anticuerpo ab121601 resultó ser el mejor para detectar Lrba en células murinas, ya que se observó una expresión diferencial en tres órganos linfoides (bazo, médula ósea y timo), también se encontró un incremento en la expresión de Lrba al estimular linfocitos B con LPS y la expresión diferencial en tres estadios de diferenciación de linfocitos B: transicionales 1, transicionales 2 y maduras. Los ensayos de microscopía confocal indicaron que dicho anticuerpo es útil para detectar LRBA en células humanas, sin embargo, no se logró su detección en células de ratón, por lo que de manera general, podemos concluir que el anticuerpo ab121601 es útil para detectar Lrba por WB y citometría de flujo en muestras provenientes de tejidos de ratón.

INTRODUCCIÓN

El nacimiento de la inmunología como ciencia, se atribuye a Edward Jenner por el descubrimiento de la vacunación como una herramienta para la prevención de la viruela en el siglo XVIII (Murphy, Travers y Walport, 2009) y aunque esta práctica fue utilizada desde siglos antes en India, Africa y China (Riedel, 2005), es un hecho que desde tiempos remotos el ser humano ha intentado discernir la forma en que nuestro organismo se defiende ante amenazas externas, para mantenerse saludable.

Un ejemplo es el hallazgo de un gen descubierto por Wang y su equipo en 2001, denominado *Lrba* y cuya expresión de RNA mensajero es inducible en linfocitos y monocitos de ratón tras haber sido estimulados con lipopolisacárido bacteriano. Aunque actualmente se sabe que mutaciones deletéreas en dicho gen producen inmunodeficiencia común variable de inicio temprano y una sobreexpresión de éste se encuentra en determinados individuos con cáncer de mama y próstata, el mecanismo de acción de la proteína a la que da lugar aún es desconocido.

Este trabajo intenta, en primera instancia, proporcionar herramientas que permitan a la comunidad involucrada en ciencias biológicas y de la salud, profundizar en el conocimiento generado de esta proteína a partir de un modelo murino, valiéndose de técnicas como citometría de flujo, microscopía confocal y Western blot.

MARCO TEÓRICO

1. SISTEMA INMUNE

El sistema inmune comprende un conjunto de células y biomoléculas que tienen como objetivo mantener protegido al organismo ante amenazas externas tales como microorganismos y toxinas, así como la eliminación de células tumorales, lo que nos permite interactuar con el medio que nos rodea y poder distinguir lo propio de lo extraño. En otras palabras, es una serie de mecanismos que inhiben e impiden la entrada de patógenos que

podieran poner en riesgo la homeostasis del organismo (Actor, 2014). El componente reconocido como extraño, se denomina antígeno y puede ser de carácter proteico, polisacárido, lipídico o un ácido nucleico, que si es lo suficientemente complejo y de tamaño adecuado puede desencadenar actividad inmune y convertirse en inmunogénico (Mathews, van Holde y Ahern, 2002). La inmunidad de un organismo vertebrado puede dividirse funcionalmente en innata y adaptativa, aunque se ha comprobado que ambos componentes actúan de manera conjunta para lograr con éxito la respuesta inmunológica.

1.1. INMUNIDAD INNATA

Son los mecanismos que incluyen barreras físicas y factores bioquímicos considerados como la primera línea de defensa ante una enfermedad infecciosa, su acción es de forma inmediata una vez que interactúan con el antígeno o agente patógeno y están presentes desde el nacimiento. Incluyen componentes anatómicos, fisiológicos, fagocíticos, o inflamatorios (Cuadro 1) y son ampliamente efectivos para retener la infección (Actor, 2014).

Cuadro 1. Componentes del sistema inmune innato (Editado de Actor, 2014)

Componente	Efactor	Función
Barreras fisiológicas y anatómicas	Piel, membranas mucosas, temperatura y mediadores químicos	Limitan la entrada, esparcimiento y replicación de patógenos. Lisis directa de patógenos y células infectadas. Activación de otros componentes inmunológicos.
Mediadores inflamatorios	Complemento, citocinas, interferones, lisozimas, defensinas, lactoferrina, proteínas de fase aguda, leucotrienos y prostaglandinas	Lisis directa de patógenos y células infectadas. Activación de otros componentes inmunológicos. Destrucción bacteriana. Mediadores de respuesta. Vasodilatación e incremento de permeabilidad vascular.
Componentes celulares	Células polimorfonucleares <ul style="list-style-type: none"> • Neutrófilos, eosinófilos • Basófilos y células cebadas 	Fagocitosis y destrucción intracelular de microorganismos
	Células fagocíticas-endocíticas <ul style="list-style-type: none"> • Monocitos, macrófagos y células dendríticas 	Presentación de antígeno a linfocitos
	Células linfocíticas <ul style="list-style-type: none"> • Células NK 	Destrucción de células infectadas con virus y células cancerosas.

La respuesta innata consiste en tres mecanismos principales: fagocitosis, que es la habilidad de algunas células para internalizar antígenos y destruirlos; inflamación, la respuesta del organismo a algún daño; y citotoxicidad, eliminación de células infectadas o transformadas vía apoptosis o muerte celular programada. La respuesta inmune innata es primitiva, sin habilidad de memoria y no se intensifica cuando hay un segundo encuentro con el patógeno. (Bellanti, Escobar-Gutiérrez y Tsokos, 2012).

Las células del sistema inmune innato reconocen estructuras altamente conservadas del patógeno denominadas PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) mediante receptores denominados PRRs (Receptores de Patrones de Reconocimiento), localizados en la membrana celular o en diversos fluidos corporales (Bellanti et al., 2012). Los receptores membranales más comunes con los TLRs o receptores tipo Toll y se encuentran en neutrófilos, monocitos, células dendríticas, linfocitos T y B. Los PAMPs que destacan son lipopolisacáridos (LPS), nucleótidos CpG no metilados y RNA de doble cadena (Toche, 2012). Por su localización en diferentes células, constituyen un puente entre la inmunidad innata y adaptativa.

1.2. INMUNIDAD ADAPTATIVA

También llamada inmunidad adquirida, es una respuesta que tiene mayor especificidad y que tarda más tiempo en presentarse en comparación con la inmunidad innata, debido a que se requiere un contacto previo con el antígeno para llevarse a cabo y cuyos componentes principales son los linfocitos, caracterizados por contar con receptores en su superficie que reconocen específicamente a cada antígeno. Las características del sistema inmune adaptativo son: especificidad, memoria, diversidad, especialización y no reactiva ante lo propio, que es logrado gracias a diversos procesos moleculares a lo largo de su desarrollo (Toche, 2012).

1.2.1. ÓRGANOS LINFÁTICOS

El sistema linfáticos consiste en dos compartimentos: un componente central en el cual las células troncales que se originan en la médula ósea, proliferan y se diferencian en el timo y médula ósea sin entrar en contacto con el antígeno (diferenciación antígeno independiente); y un componente periférico que consiste en nódulos linfáticos, bazo y MALT (tejido linfático asociado a mucosas), sitios en los cuales éstas células pueden reaccionar con el antígeno (diferenciación antígeno dependiente) (Bellanti et al., 2012).

1.2.1.1. BAZO

Después del tejido linfático asociado al intestino (GALT), el bazo es el órgano linfático más grande del cuerpo y el órgano filtrador más grande (Vale et al., 2015). Se encuentra en la cavidad abdominal, debajo del diafragma y conectado al estómago. Está formado por vasos arteriales organizados en ramificaciones que terminan en el sistema sinusoidal venoso y rodeado por una cápsula fibrosa y tejido conectivo, derivando en la trabécula, que soporta el tejido vascular (Figura 1). Las ramificaciones más pequeñas están envueltas de tejido linfático, que forma la pulpa blanca del bazo. En roedores, algunas de las ramificaciones arteriales más pequeñas, terminan en el seno marginal (el espacio entre la pulpa blanca y alrededor de la zona marginal) mientras otras atraviesan la zona marginal para formar el sistema venoso de la pulpa roja (Mebius y Kraal, 2005).

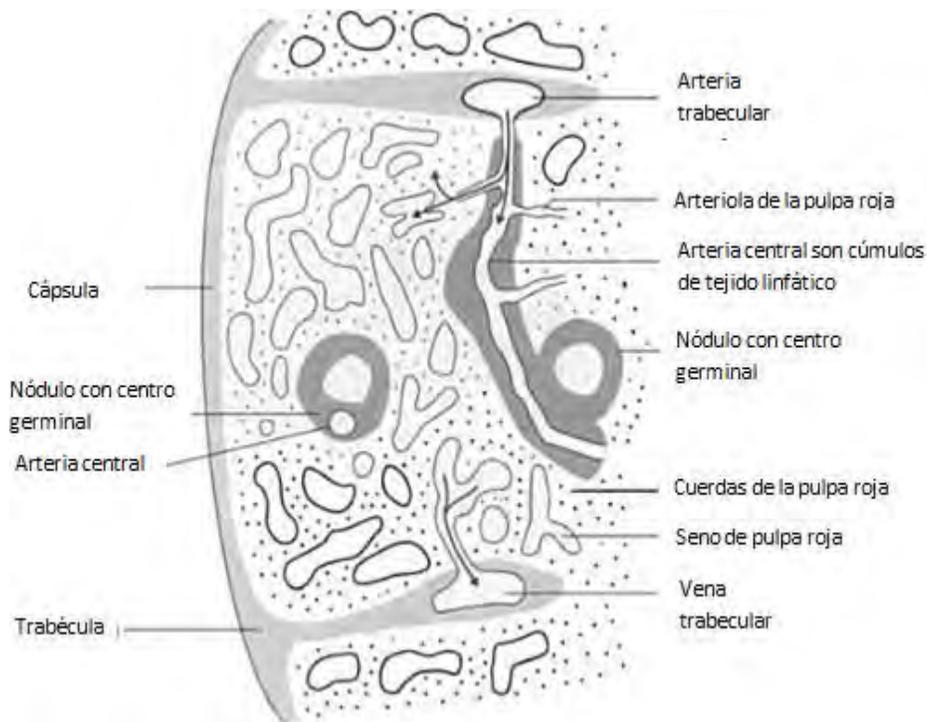


Figura 1. Representación de la estructura histológica del bazo. La pulpa blanca está formada por tejido linfoide (nódulos y centros germinales) ubicada alrededor de las ramificaciones arteriales post-trabeculares. La pulpa roja es formada por una red reticular, llamada cuerdas esplénicas, y por canales vasculares, llamados senos esplénicos. Las flechas indican la dirección del flujo sanguíneo (Editado de Henrikson y Mazurkiewicz, 1997)

La pulpa roja es una estructura especializada del sistema venoso que tiene la capacidad de filtrar la sangre y remover eritrocitos viejos. La sangre arterial llega dentro de vasos a la pulpa roja, en donde además se ubican una gran cantidad de macrófagos que llevan a cabo la eritrofagocitosis, necesaria para el reciclaje de hierro. La pulpa roja también es conocida por contener plasmablastos y células plasmáticas, debido a que después de la diferenciación específica de antígeno en los folículos de la pulpa blanca, los plasmablastos migran hacia la pulpa roja, inicialmente justo afuera de la zona marginal y se cree que se localizan ahí para producir anticuerpos de entrada rápida al flujo sanguíneo. (Mebius, 2005).

Por otro lado, la pulpa blanca está organizada en segmentos de tejido linfoide con compartimientos de células T y B, que rodean vasos arteriolares. La organización y mantenimiento de la pulpa blanca se logra por la acción de quimiocinas que atraen a células B y T a sus respectivos nichos. En la zona de células T (también conocida como vaina linfoide periarteriolares, PALS), las células T interactúan con células dendríticas y células B, mientras

que en los folículos de células B (también conocido como zonas de células B), ocurre la expansión clonal de células B activadas, lo que permite la hipermutación somática y el cambio de isotipo (Mebius, 2005).

En el bazo, la zona marginal es un área importante en la que las células dejan en flujo sanguíneo para entrar a la pulpa blanca y cuenta con dos subpoblaciones de macrófagos: macrófagos de zona marginal y los macrófagos metalofílicos de zona marginal, lo cuales son eficientes en la respuesta en contra de patógenos específicos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. (Mebius, 2005).

1.2.2. LINFOCITOS T

Constituyen el principal mecanismo de defensa contra microorganismos intracelulares bacterianos o virales ya sea por promover su fagocitosis o eliminación de células infectadas. A su vez, se dividen en células T CD4⁺, cuya función principal es la secreción de citocinas, y células T CD8⁺, que se encargan de eliminar células infectadas y tumorales (Cuadro 2).

Cuadro 2. Subpoblaciones de linfocitos T (Bellanti et al., 2012 y Toche, 2012)

CD4/CD8	Subpoblaciones	Función
Células T CD4 ⁺	• Th1	Secreción de TNF, IFN- γ e IL-2, para activar macrófagos, NK y linfocitos T CD8 ⁺ . Estimulan la producción de IgG por parte de los linfocitos B
	• Th2	Secreción de IL-4 e IL-10, lo que ayuda a la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas. Participan en la maduración y migración de eosinófilos.
	• Th17	Producen IL-17, importantes en procesos patológicos de autoinmunidad, como artritis reumatoide, psoriasis y esclerosis múltiple .
	• Treg	Expresan el factor de transcripción FOXP3 y usualmente secretan IL-10 y TGF- β y son importantes para el reconocimiento de auto antígenos, inflamación crónica en infecciones virales, alergia, trasplantes y alergia
Células T CD8 ⁺	• Tc1 y Tc2	Destruyen a las células infectadas o tumorales que expresan MHC-I y también son estimuladas por las citocinas producidas por las células T CD4 ⁺

Cuando un antígeno se encuentra con una célula dendrítica o macrófago presente en el epitelio, es fagocitado y procesado en el interior de la APC, finalmente se asocia con el MHC, lo que le permite ser presentado en la membrana. Existen varios tipos de APC y se localizan en diferentes áreas anatómicas del cuerpo: macrófagos y células dendríticas en casi todos los tejidos, macrófagos alveolares en pulmones, células de Langerhans en la piel, células de Kupffer en el hígado, células microgliales en el sistema nervioso central y linfocitos B, células dendríticas y macrófagos en tejidos linfoides (Bellanti et al., 2012).

Estas APC migran a través del torrente linfático, alcanzando así ganglios linfáticos regionales o el bazo. Los linfocitos T no activados o naive recirculan a través de estos órganos continuamente, y cuando se encuentra con una APC que presenta su epítipo específico a través de su TCR, ocurre la proliferación y diferenciación a linfocitos T efectores, que pueden migrar al sitio de infección o inflamación (Bellanti et al., 2012).

1.2.3. LINFOCITOS B

LeBien y Tedder en 2008 mencionan que una simple definición de las células B es: una población de células que expresan clonalmente diversas inmunoglobulinas de superficie, receptores que reconocen específicamente epítopos antigénicos. Su origen filogenético puede remontarse hace aproximadamente 500 millones de años, apareciendo en los vertebrados.

El descubrimiento de las células B comenzó por la caracterización de las inmunoglobulinas y posteriormente el hallazgo de las células plasmáticas como fuente de anticuerpos en 1948. Esto llevó a dos teorías opuestas encabezadas por Niels Jerne que propuso que los anticuerpos producidos por una célula plasmática se rigen por medio de la selección natural, mientras que Sir Macfarlane Burnet propone la existencia de un gran número de células formadoras de anticuerpos, cada una de las cuales está programada genéticamente para producir anticuerpos de gran especificidad, conocida como la teoría de selección clonal (Moticka, 2015).

En 1956, Glick y colaboradores encontraron que, al extirpar la bolsa de Fabricio, un órgano linfoide asociado al intestino presente en pollos, había una reducción de anticuerpos séricos. De esta forma, los linfocitos B adquirieron el nombre de células B: células derivadas de la bolsa de Fabricio (Kersey, 1975), lo que permitió que a mediados de los años 60's y principios de los 70's otros investigadores como Max Cooper y Robert Good ahondaran en el estudio de dichas células utilizando otros modelos animales como ratones (LeBien et al., 2008), asignándoles su importancia en la formación de centros germinales, producción de células plasmáticas y anticuerpos. Además, se demostró que en la bolsa de Fabricio había linfocitos con alta densidad de inmunoglobulinas en su membrana, y las denominaron precursoras de células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas (Kersey, 1975).

El tamaño de los linfocitos oscila entre 6 y 10 μm dependiendo del estadio de maduración, clasificándose en pequeños, medianos o grandes. Se diferencian de otras células sanguíneas por su citoplasma basófilo y con gránulos azurófilos al teñirlas con azul de metileno y un núcleo heterocromático grande y ovalado (Figura 2).

Morfológicamente, no es posible diferenciar las subpoblaciones de linfocitos (Meyer, 1985), pero gracias al uso de marcadores tipo CD (cluster differentiation) que pueden ser analizados por citometría de flujo, en ratones se distinguen las células B por la expresión membranal de CD45R/B220, también se utiliza CD19 tanto en humanos como en ratones. Para identificar subpoblaciones de linfocitos B se utilizan otros marcadores dependiendo de lo que se analice (Bellanti et al., 2012, Monroe y Rothenberg, 1998).

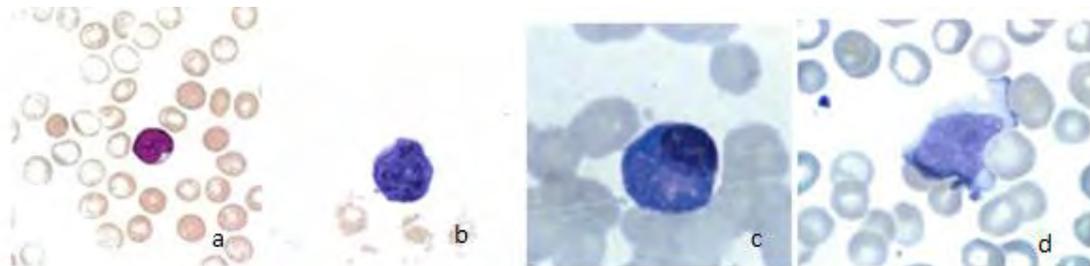


Figura 2. Tinción de Wright de linfocitos. (a) Prolinfocito. (b) Linfocito. (c) Plasmocito. (d) Linfocito activado. (Tomado de Rodak, 2005).

Son las células responsables de la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas, por lo que representan el elemento humoral de la inmunidad adaptativa. Las inmunoglobulinas tienen la función de reconocer específicamente a las moléculas de los patógenos que desencadenaron la respuesta inmune, lo que permite el reclutamiento de moléculas y células que eliminen a dicho patógeno, como es el caso de la activación de la cascada del complemento y de la fagocitosis (Murphy et al., 2009).

Además de la producción de anticuerpos, se han encontrado otras funciones a las células B como son la cooperación con las células T CD4+ en presencia de bajas concentraciones de antígenos o auto-antígenos, debido a que como se mencionó anteriormente, también actúan como APC. Otras funciones son la producción de citocinas IFN- γ e IL-6, organogénesis de tejidos linfoides, producción de auto anticuerpos, anticuerpos naturales y anticuerpos adaptativos, inmunidad en tumores y rechazo de transplantes. Además, se ha descrito la existencia de linfocitos B reguladores, denominados células B10 que muestran una regulación únicamente en la inflamación mediada por células T a través de la producción de IL-10 (LeBien et al., 2008).

Existen diferentes poblaciones de linfocitos B con capacidad de producción de anticuerpos identificadas con mayor claridad en ratones:

- A. Linfocitos B convencionales (también conocidos como linfocitos B foliculares o linfocitos B-2 o linfocitos B-0). Son los responsables de la respuesta inmune adaptativa produciendo anticuerpos de alta especificidad al reconocer un antígeno peptídico y casi siempre de manera T dependiente, es decir por la cooperación de los linfocitos T. El desarrollo se lleva a cabo en médula ósea y bazo (Merino y Gruppi, 2006).
- B. Linfocitos B de zona marginal esplénica (MZ). Comparten el mismo origen medular de las células B2 pero al entrar al bazo, fueron sometidas a estímulos diferentes por medio de su BCR, por lo que su diferenciación fue distinta. Sus funciones son la producción de IgM a bajas concentraciones de antígeno, secreción de IL-10, respuesta

a antígenos T independientes, transporte de antígenos a células dendríticas foliculares mediado por complemento y presentación de antígeno a células T-NK, ya que una vez reconocido el antígeno a través de su BCR, lo internaliza, lo procesa en el fagolisosoma y finalmente lo presenta en una MHC-II membranal (Bemark, 2015, Murphy et al., 2009 y Lund, 2008).

- C. Linfocitos B-1. Al igual que los linfocitos B MZ, son responsables de la producción de los anticuerpos naturales, es decir IgM que se secretan de forma innata y contribuyen en la primera línea de defensa contra agentes infecciosos extracelulares, particularmente importantes frente a la respuesta a bacterias encapsuladas como *Streptococcus pneumoniae*, aunque la unión antígeno-anticuerpo no tiene mucha afinidad. Su ubicación anatómica es mayoritariamente en cavidad peritoneal y pleural (30%-60% de los linfocitos totales de esa área) y una menor proporción en bazo (0.2%-1% de linfocitos totales). Presentan características de células activadas y son de mayor tamaño y complejidad que los linfocitos B-2. El mecanismo de secreción de anticuerpos de éstas células es diferente a los linfocitos B2 y además de producir IgM natural, también son importantes en la producción de IgA e IgG3 (Merino et al., 2006).

De esta forma, se puede decir que las subpoblaciones de linfocitos B también plantean un puente entre la inmunidad innata y la adaptativa, pues en minutos a horas el patógeno que logra entrar al organismo se encuentra con los anticuerpos naturales, en horas a días los linfocitos B-1 y de zona marginal son activados de forma T-independiente por el microorganismo o sus productos, y finalmente, en días a semanas el patógeno activa a los linfocitos T así como a linfocitos B foliculares para ensamblar una respuesta con mayor afinidad y especificidad (Figura 3) (Vale et al., 2015).

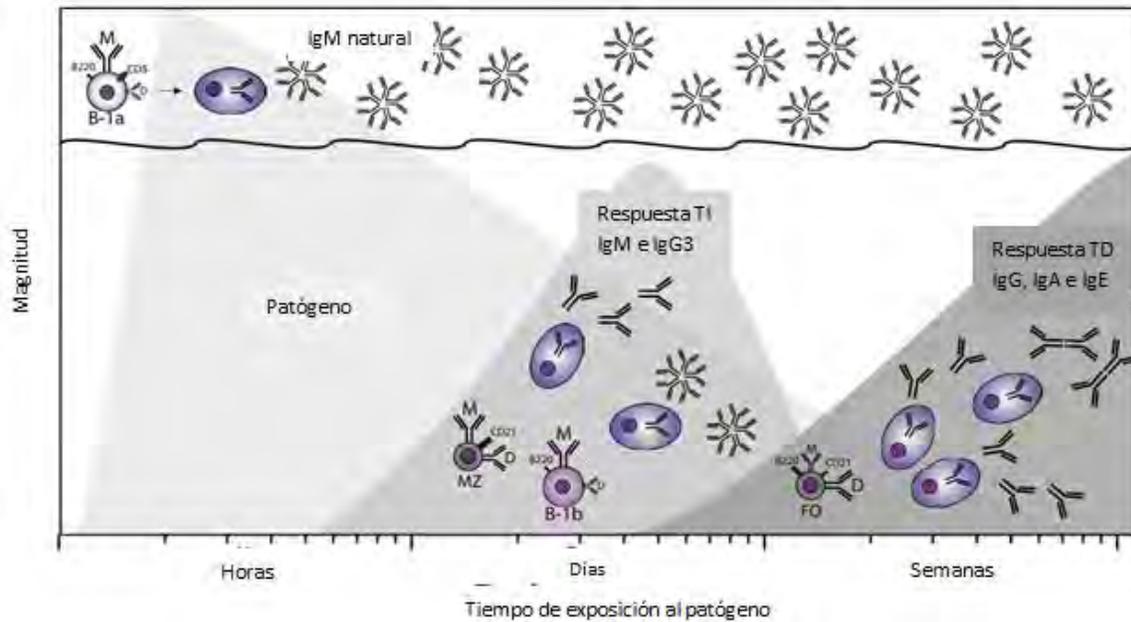


Figura 3. Función de las subpoblaciones de linfocitos B. La imagen muestra la acción de los linfocitos B tras el contacto con un patógeno. (Editado de Vale et al., 2015).

1.2.3.1. ESTRUCTURA DE LOS ANTICUERPOS Y RECEPTOR DE LA CELULA B

La historia del descubrimiento de la estructura de los anticuerpos o inmunoglobulinas inicia con el hallazgo de Emil von Behring y Shibasaburo Kitasato en 1890, de la propiedad terapéutica de sueros de conejo inmunizados contra tétanos y contra difteria, demostrando así la inmunidad pasiva o transmitida. (Ramos-Bello y Llorente, 2009).

En 1972 la estructura química de la molécula del anticuerpo fue elucidada por Gerard Edelman y Rodney Porter, con lo que ganaron el premio Nobel en Fisiología y Medicina en ese mismo año. Al digerir la inmunoglobulina con papaína, identificaron dos fracciones (I y II) aparentemente similares y un fragmento (fracción III) completamente diferente. Los fragmentos I y II tienen afinidad de unión al antígeno, que hoy se conocen como Fab (Fragmento de unión al antígeno). El fragmento III puede ser cristalizado, por lo que se denominó Fc o fragmento cristalizante que es la región que le permite interactuar con otros componentes del sistema inmune, indicando que los Fc de anticuerpos con diferentes

especificidades eran prácticamente homogéneas y los Fab, que no podían ser cristalizados tenían una amplia variabilidad en los aminoácidos que las componen (Figura 4).

Alfred Nisonoff, utilizó pepsina para tratar IgG de conejos y propuso un modelo que consiste en cuatro cadenas: dos ligeras (L, del inglés light) y dos pesadas (H, del inglés heavy); poco tiempo después se describieron dos tipos de cadenas ligeras denominados κ y λ . La configuración en forma de Y se confirmó mediante estudios de difracción de rayos X y microscopía electrónica (Ramos-Bello y Llorente, 2009). Tanto la cadena pesada como la ligera se dividen en regiones referidas como dominios variables (V) y constantes (C). La región variable se encuentra en los primeros 110 aminoácidos de las cadenas L y H ubicados en el extremo N-terminal y dentro de estas regiones existen fragmentos polipeptídicos denominados CDRs (Regiones Determinantes de Complementariedad) o HVR (Regiones de hipervariabilidad) que son excepcionalmente variables en sus aminoácidos. La región constante de la Ig no difiere dentro de un mismo isotipo y abarca las porciones LC y HC (Bellanti et al., 2012).

Otro componente importante es la región bisagra, ubicada entre los dominios CH1 y CH2 y caracterizada por ser rica en residuos de cisteína, por lo que se forman puentes disulfuro que le permiten a la molécula una mayor flexibilidad, lo que mejora el potencial de unión al antígeno. Aunque los isotipos IgM e IgE no tienen la región bisagra, sus CH2 cumplen la función de dicha estructura (Bellanti et al., 2012).

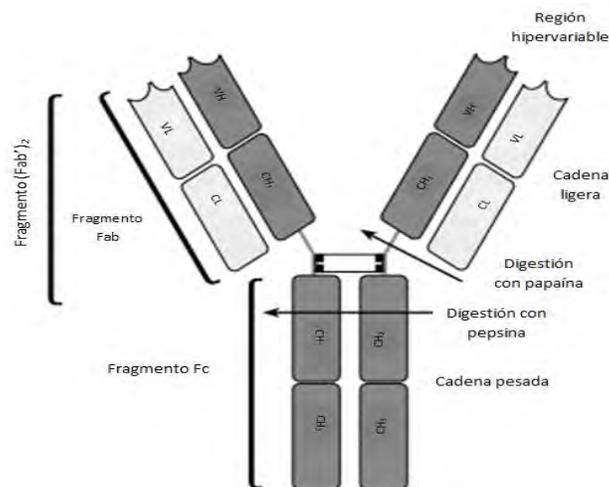


Figura 4. Estructura de la IgG (Editado de Ramos-Bello et al., 2009)

1.2.3.2. DESARROLLO DE LINFOCITOS B

a) Desarrollo del linfocito B en médula ósea

Al inicio de la respuesta inmune, los linfocitos son activados para producir una gran cantidad de IgM, que tiene poca o mediana afinidad hacia el antígeno y comunmente se encuentra en el flujo sanguíneo que por su carácter pentamérico, es imposible que atraviese el endotelio y actúe en los tejidos. Para que ocurra una maduración en la afinidad de dichos anticuerpos, se requieren dos procesos: hipermutación somática (SHM) y el cambio de isotipo (CSR, por sus siglas en inglés, class switch recombination). En la primera, ocurren numerosas mutaciones puntuales en las regiones V(D)J, mientras que en la CSR se lleva a cabo el reemplazo de la región constante de la cadena pesada, cambiando de $C\mu$ a $C\gamma$, $C\alpha$ ó $C\epsilon$, lo que resulta en expresión de IgG, IgA o IgE, respectivamente (Pone, Xu, White, Zan, y Casali, 2012).

Por esta razón, las fases que definen el desarrollo de células B dependen en el rearrreglo de genes que codifican los componentes descritos en el BCR, es decir, las cadenas L y H de la inmunoglobulina y los componentes $Ig\alpha$ - $Ig\beta$, así como su expresión y asociación, culminando en controles que prueban la funcionalidad de la IgM que exprese, lo que lleva a la generación de un amplísimo repertorio de linfocitos que actúen contra diferentes antígenos y que no sean autorreactivos. Como se describió anteriormente los principales subgrupos de linfocitos B son: B-1 y B-2 en donde se proponen dos modelos para explicar su existencia: el primer modelo está basado en la existencia de dos linajes diferentes que dan lugar a las células y el segundo modelo propone que la especificidad e intensidad de la señalización de BCR da lugar a estas dos poblaciones (Vale et al., 2015). Los linfocitos B-2 son los más abundantes, por lo que, a partir de ahora, son a los que se refiere el presente trabajo.

El desarrollo de linfocitos B inicia desde la vida embrionaria con la aparición de células troncales pluripotenciales que incluyen a los progenitores de células B dentro de la esplecnopleura aórtica y al día 11 de gestación en ratones y a la semana 7 en humanos, residen en el hígado. Poco después del nacimiento, en el segundo trimestre en humanos, los progenitores se localizan en la médula ósea, convirtiéndose ésta en el tejido en el que ocurre

la linfopoyesis hasta la edad adulta, cuando la producción de nuevas células se reduce paulatinamente (Vale et al., 2015).

En la médula ósea se encuentran células troncales y células estromales que, al interactuar, se producen factores de crecimiento y de señalización necesarios para la maduración y diferenciación de células hematopoyéticas y por ende de las células del sistema inmune (Gulati, Ashton y Hyun, 1988). La diferenciación celular inicia con la asignación del linaje mieloide (que dará lugar a las células del sistema inmune innato) y el linaje linfoide (que dará lugar a linfocitos T, B y NK).

Una vez asignado el linaje linfoide, según la nomenclatura propuesta por Hardy (Figura 6), la siguiente etapa es la fracción A o el estadio pre-pro-B, en el que se sintetiza la cadena pesada de IgM, que se asocia a las proteínas $\lambda 5$ y VpreB, cuya función es actuar como sustituto de la cadena ligera, pues aún no se ha constituido en esta etapa. En la siguiente etapa, la fracción B, correspondiente al estadio pro-B, ocurre el rearreglo de los segmentos génicos que formarán la cadena pesada del pre-BCR formado por $Ig\mu$, VpreB y $\lambda 5$, una vez expresada esta molécula, se asociará al heterodímero $Ig\alpha$ - $Ig\beta$.

En el siguiente estadio, la célula pre-B (o fracción C') las células que tienen un pre-BCR correcto, proliferan gracias a que la unión con $\lambda 5$ y VpreB fue exitosa. En la fracción D que también conforma al estadio pre-B, se lleva a cabo la construcción de la cadena ligera, conformada por los segmentos VL-JL (Hardy y Hayakawa, 2001). De esta forma, el linfocito expresa IgM en su superficie y bajo este esquema, se considera como una célula B inmadura que puede abandonar la médula ósea e ingresar al bazo a través de la arteria central esplénica, para continuar su desarrollo en el bazo y son llamadas células B transicionales.

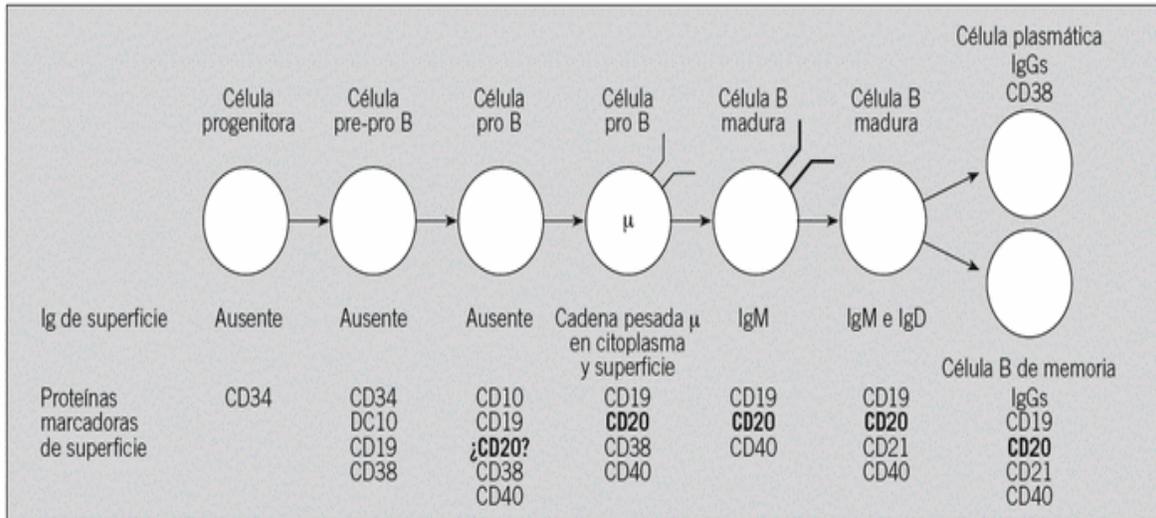


Figura 6. Desarrollo de linfocitos B y fenotipo de sus componentes. (Serrano, 2007).

b) Desarrollo del linfocito B en órganos linfáticos periféricos

Al entrar al bazo, el desarrollo de los linfocitos B se divide de manera general en tres fases: transicionales 1 (T1), T2 y maduras (Allman y Pillai, 2008) y se ha demostrado que el paso de una fase a otra depende de la señalización a través de su BCR. Cabe aclarar que la nomenclatura de estas subpoblaciones aún no ha sido unificada, pues incluso se ha propuesto la existencia de células T3 que son derivadas de T2 o células maduras anérgicas, por lo que otros investigadores utilizan criterios diferentes para diferenciarlas (Bemark, 2015).

Las células transicionales tienen una vida media que va de 3 a 5 días y se estima que forman del 5 al 10% de las células B en ratones adultos (Bemark, 2015). Las células T1 se encuentran en la pulpa roja del bazo y se ha observado que son sometidas a diversos puntos de control por lo que hay más células eliminadas de las que son generadas en la médula ósea gracias a la selección negativa, que consiste en la apoptosis de células cuyo BCR interactúa con autoantígenos, con lo que se previene la formación de células B maduras autorreactivas. Una vez ocurrido esto, aquellas células que sobreviven, se convierten en T2 y migran a la pulpa blanca del bazo; en esta etapa, las células son más grandes y una gran porción se encuentra en la fase G2-M del ciclo celular, indicando que hay una gran acumulación de moléculas utilizadas en mitosis (M) (Loder et al., 1999).

En el estadio T2 la unión del antígeno con una afinidad baja a intermedia hacia antígenos propios, lleva a su supervivencia, sin embargo, los mecanismos de supervivencia de los T2 dirigida por la selección positiva aún permanece desconocida. La alta concentración o la alta afinidad al antígeno lleva a la diferenciación de células B hacia células plasmáticas de corta vida, mientras que la baja afinidad al antígeno o baja concentración de éste, lleva a la formación de centros germinales (GC), los cuales son microambientes especializados que están constituidos por células dendríticas foliculares, éstas actúan como soporte de una intensa proliferación de células B.

En los centros germinales también se llevan a cabo la HSM, así como una selección dirigida por la afinidad al antígeno, dando lugar a la maduración de la afinidad de los anticuerpos, es decir la producción de anticuerpos de isotipo diferente a IgM que además sean específicos para cada antígeno. Las células B-2 o células B se generan continuamente en la médula ósea a través de sus progenitores, lo que da lugar a las células B de zona marginal y foliculares. Los primeros, llevan a cabo principalmente respuestas de tipo T-independiente al encontrarse con los antígenos presentes en el flujo sanguíneo, mientras que los segundos, al estar en proximidad a la zona de células T llevan a cabo respuestas de tipo T-dependientes. Las células B foliculares son linfocitos recirculantes que capturan antígenos traídos de los vasos linfáticos y actúan como células presentadoras de antígenos derivados de péptidos a las células T (Vale et al., 2015).

1.2.3.3. ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS B

Muchos antígenos de origen proteico o peptídico requieren de la cooperación de células T para llevar a la activación de linfocitos B y su consecuente producción de anticuerpos (respuesta T-dependiente, TD), sin embargo, existen polisacáridos y lipopolisacáridos que pueden inducir la activación de éstas células sin necesidad de la cooperación de los linfocitos T, constituyendo así la respuesta T-independiente (TI).

En la respuesta TD, el antígeno es internalizado por la célula B, vía su BCR, para posteriormente procesarlo y presentarlo en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II) a células T específicas de antígeno. Una vez activadas, las células T facilitan la respuesta de células B y cambio de isotipo mediante la expresión de citocinas y moléculas coestimuladoras.

En la respuesta TI, el antígeno estimula la producción transitoria de IgM con poca o nula producción de IgG, IgA e IgE. Los antígenos TI tipo 1 (TI-1) son activadores policlonales de células B, como es el caso de LPS, mientras que los antígenos TI tipo 2 (TI-2) consisten en estructuras bioquímicas repetitivas, como polisacáridos o glicoproteínas que pueden interactuar con el BCR (Pihlgren, et al., 2013).

La respuesta TI se lleva a cabo mediante receptores tipo Toll (TLR's), una familia de proteínas que reconocen productos bacterianos como es el caso del LPS, el DNA bacteriano, flagelina, entre otros. Los TLRs facilitan la entrada de los linfocitos B a los centros germinales antes de que estén disponibles células T específicas de antígeno y una respuesta TD sea posible.

La respuesta por medio de TLR es amplificada por la señalización antígeno específica mediada por el BCR, promoviendo la proliferación de células B y una eficiente inducción de recombinación de DNA para el cambio de isotipo (CSR) de la Ig. Esto ocurre en la respuesta a LPS en ratones: la porción lipídica, denominada Lípido A, se une a TLR-4 y el componente polisacáridico, (el antígeno-O) interactúa con el BCR del linfocito B. La integración de las

señales del BCR y TLR resultan en la activación de factores de transcripción como NF- κ B, resultando en inducción de las proteínas que favorecerán la transcripción germinal de las regiones de cambio (Switch) de la cadena pesada de la Ig, entre otras (Pone, 2012).

Los TLRs son expresados ampliamente en células B-1, células B MZ y células B2 maduras. La activación policlonal dirigida por TLR es aumentada por BAFF y APRIL, íntimamente relacionadas con el cambio de isotipo hacia IgA. La señalización de TLR en linfocitos B es esencial para una respuesta TD efectiva, pues aumenta la respuesta con IgG1. La activación de células T y B en la respuesta TD es impulsada por células dendríticas que a su vez también son estimuladas vía TLR, éstas células secretan citocinas como IL-4, IFN- γ , TGF- β , BAFF y APRIL, citocinas que favorecen la sobrevivencia y el cambio de isotipo en linfocitos B.

La señalización con TLR4 aumenta el tráfico de linfocitos B en los nódulos linfáticos, las interacciones de linfocitos B con otras células en los folículos, el acceso a los centros germinales, eventos que resulta en la diferenciación hacia células plasmáticas productoras de IgG1, IgG2a e IgG2b. Las células B expresan altos niveles de TLRs: TLR-1, TLR-2 (TLR-1/2 como heterodímero), TLR-4 (en ratones) y TLR-5 en la superficie, y TLR-3 (en humano), TLR-7, TLR-8 y TLR-9 en endosomas. LA CSR inducida por TLRs es ineficiente, con excepción de la producida por LPS, pues se une tanto a TLR4 como al BCR (Pone et al., 2012).

2. Lrba (Lipopolysaccharide responsive beige-like anchor protein)

Debido a la notable importancia que tiene LPS en la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos B, Kerr, Heller y Herzenberg publicaron un estudio en 1996 en el que diseñaron un ensayo que les permitió identificar un pequeño grupo de genes que es sobreexpresado en una línea celular de linaje B (línea 70Z/3) cuando son estimuladas con LPS. Además, reportan una expresión dependiente del estadio de diferenciación, lo que sugiere que dichos genes pueden estar involucrados en el desarrollo de células.

Con la finalidad de indagar más en el tema, en 2001, Wang, Howson, Haller y Kerr publicaron un estudio en el que lograron aislar e identificar un gen con las características anteriores. El procedimiento, consistió en el aislamiento de mRNA obtenido a partir de líneas celulares de ratón, así como hígado y timo de ratones C57BL6/J estimuladas in vitro con LPS. Posteriormente sintetizaron el cDNA para clonar y secuenciar los genes que se expresaron tras la estimulación y lo denominaron *lba* (LPS-responsive beige-like anchor), comparando las células de hígado con linfocitos B, tanto transformadas como de los ratones C57BL6/J. Una vez obtenida la secuencia de *lba* ahora conocido como *lrba*, encontraron otra de 7.3 kb con alta homología en humanos llamada BGL.

También realizaron Northern blot de líneas celulares de macrófagos y linfocitos B con y sin estimulación con LPS. Midieron el nivel de expresión de *lba* en diferentes tejidos a través de RT-PCR tanto en líneas celulares como en órganos de ratones C57BL6/J. La predicción de la estructura del gen la llevaron a cabo con programas como MacVector y BLAST, mientras que la estructura de la proteína se predijo con SMART y ClustlX, representada en la Figura 7 que continúa actualizándose. Una vez conocidos los dominios de la proteína, construyeron un inserto de cDNA que incluye los dominios BEACH y WD para clonarlos en un plásmido que contiene genes que codifican una proteína verde fluorescente y posteriormente fue transfectado a diferentes líneas celulares humanas y murinas, lo que sirvió para visualizar la ubicación celular mediante microscopía confocal y microscopía inmunoelectrónica.

2.1. ESTRUCTURA DE LRBA

Existen tres isoformas de Lrba que difieren en el extremo 3', siendo *lrba- α* la más grande, al contar con 9903 pares de bases (pb) y codifica a una proteína con 2856 aminoácidos (aa), *lrba- β* 9396 pb y 2792 aa y *lrba- γ* 8854 pb y 2779 aa. Los primeros 2769 aminoácidos son idénticos en las tres isoformas, difiriendo en el número de repetidos del dominio WD ubicados en el extremo C terminal de la proteína: Lrba- α tiene 5 repetidos, Lrba- β tiene 3 y Lrba- γ carece de repetidos WD (Figura 7). Existe un aumento de 2 a 4 veces en el mRNA de esta proteína en líneas celulares de macrófagos (líneas celulares J774 y RAW276.4) y células B (líneas 70Z/3, WEHI231 y BCL1) estimuladas con LPS en comparación a las que no son estimuladas con dicha molécula (Figura 8A). Además, ocurre una expresión diferencial de las isoformas en líneas celulares de células B y tejidos de ratones (Wang et al., 2001) mostrado en la Figura 8B.

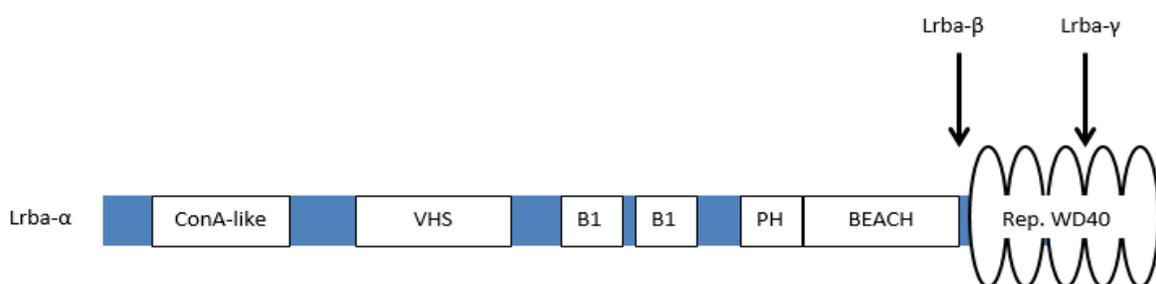


Figura 7. Estructura proteica de Lrba. LRBA está compuesta por 2863 aa, mientras que Lrba- α tiene 2856, equivalentes a un peso molecular aproximado de 319 kD. ConA-like, Concavalin A (ConA)-like lectin binding domain; VHS, [VPS (vacuolar protein sorting)-27, Hrs (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) domain and STAM (signal transducing adaptor molecule)]; B1 y B2, sitios de unión a la sub unidad reguladora RII de PKA; PH, Plekstrin Homology (PH)-like domain; BEACH, beige and Chediak-Higashi domain; Repetidos WD40, por los aminoácidos Triptófano-Ácido aspártico.

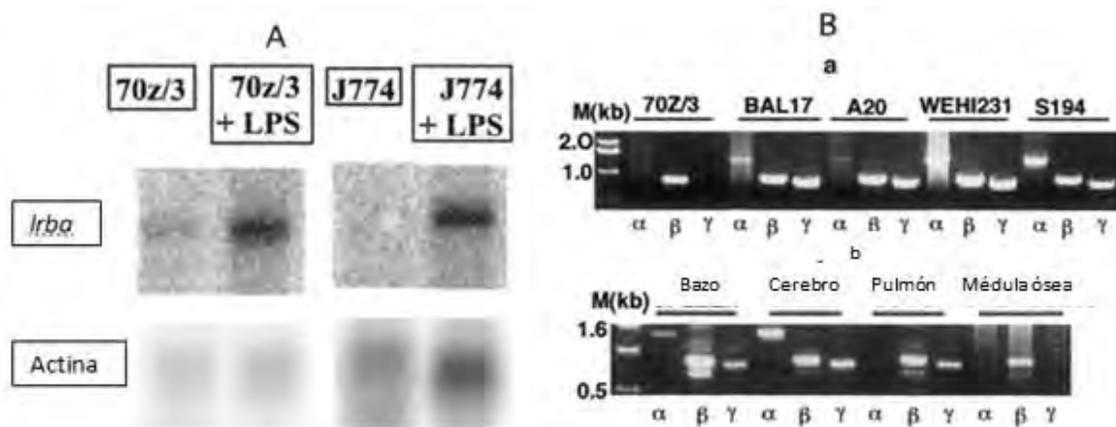


Figura 8. La expresión de *lrba* es inducible en células B y macrófagos. A. Northern blot de mRNA de líneas celulares 70Z/3 (células B) y J774 (macrófagos), ambas cultivadas con o sin LPS por 20 horas. B. Expresión de mRNA de las tres isoformas de *lrba* en líneas celulares de células B (a) y tejidos (b) mediante RT-PCR.

Las proteínas LRBA humana y Lrba murina son 90% idénticas (2587/2859 aa) y 94% positivas (29690/2859 aa) en la homología de sus aminoácidos. En humano sólo se han identificado dos isoformas: la isoforma 1 de 2851 aa y la isoforma 2 con 2863 aa, y se cree que la isoforma 1 es la principal en células B (López-Herrera et al., 2012).

Es una proteína de peso molecular predicho en 319 KD que, en personas con mutaciones en éste gen, no puede detectarse por Western blot. Tiene múltiples dominios de los cuales el dominio ConA-like es el más cercano a su extremo N-terminal: ConA o Concaivalina A es una lectina que se une a carbohidratos y fue originalmente extraída de un género de leguminosas llamado *Canavaliaensiformis* (Wang et al., 2014), por lo que se propone que el dominio ConA-like se une a oligosacáridos asociados al tráfico de proteínas a diferentes compartimentos celulares (Lodish, Berk, Zipursky, et al., 2000) especialmente en la maquinaria de fusión de vesículas (Burguess, Mornon y Saint-Basille, 2009).

El siguiente dominio es VHS, considerado importante en el reconocimiento de membranas vesiculares, por lo que podría estar involucrado en el tráfico vesicular por la unión a receptores que definen el destino de las proteínas ubicadas entre la red trans-Golgi y el compartimento endosomal. Después hay dos sitios de unión a las subunidades regulatorias RII de PKA (proteín cinasa dependiente de AMP cíclico) (Wang y Lockey, 2014), que es un tetrámero compuesto por dos subunidades C catalíticas y dos subunidades R reguladoras; el tetrámero C₂R₂ es catalíticamente inactivo que se activa cuando el AMPc se une a las

subunidades R. De esta forma, LRBA podría actuar como catalizador de PKA al unirse B1 y B2 con las subunidades R y colocarla al alcance de sustratos que requieran su acción (Mathews et al., 2012).

Finalmente, el superdominio WBW ubicado en el extremo C-terminal está compuesto del dominio WDL y BEACH seguido de repetidos WD40, dominio que comparte con otras proteínas conformando la amplia familia de proteínas definida como WBW o BDCPs (BEACH domain containing proteins). WDL es estructuralmente parecido al dominio de homología a plekstrina (PH) e interactúa ampliamente con el dominio BEACH que podría ser importante para el plegamiento y señalización de la proteína (López-Herrera et al., 2012).

El dominio PH es poco conservado estructuralmente y contiene aproximadamente 100 aminoácidos que se pliegan de tal forma que se puede asociar con membranas biológicas a través de la unión a fosfolípidos (Cullinane, Schäffer y Huizing, 2013), sin embargo, en LRBA se ha demostrado que no puede unirse a fosfolípidos (Gebauer, Li, Jogl, Shen, Myszka y Tong, 2004).

El dominio de repetidos WD40 es altamente conservado entre las especies y es uno de los dominios más abundantes en eucariontes que puede unirse a diferentes patrones, de diferentes maneras, lo cual es importante para las interacciones proteína-proteína y DNA-proteína, señales de transducción, tráfico vesicular, ensamblaje de citoesqueleto, ciclo celular, apoptosis, dinámica de cromatina y regulación transcripcional (López-Herrera et al., 2012).

Tanto LRBA como Lrba tienen una región de interacción con la cadena ligera 3 (LC3) de proteínas asociadas a microtúbulos (LIR), lo que podría indicar que LRBA puede servir como adaptador de proteínas ubiquitinizadas destinadas a degradación a través de una asociación LC3 y LIR. La fosforilación puede impedir que LRBA se una con LC3, inhibiendo la autofagia, pero favoreciendo el crecimiento celular, dando soporte al hecho de que cuando LIR es fosforilado en ciertos tipos de cánceres como los de pulmón, glándula mamaria, riñón, vejiga, gástrico y leucemia (Wang et al., 2014).

2.2. PARÁLOGOS DE LRBA

Mucha de la información acerca de ésta proteína se obtiene de estudios de sus homólogos, debido a las similitudes estructurales que sugieren similitudes funcionales. Estudios bioinformáticos muestran que LRBA es una proteína conservada en organismos unicelulares y multicelulares que probablemente existe en todo el reino eucariota. Como se mencionó anteriormente, LRBA es una proteína perteneciente a la familia BDCPs con función de andamiaje y tráfico vesicular, por lo que son importantes en enfermedades humanas (Cuadro 3 y Figura 9), (Wang et al., 2014).

Cuadro 3. Proteínas pertenecientes a la familia BDCP. Estas proteínas pueden aparecer con otros nombres en la literatura y tienen la peculiaridad de relacionarse con aspectos inmunológicos y/o neuronales (Cullinane et al., 2013)

Abreviatura	Sinónimos	Nombre	Condición relacionada
LYST	CH, CHS1	Lysosomal trafficking regulator	Síndrome de Chediak-Higashi
NBEA	BCL8B, LYST2	Neurobeachin	Autismo Formación de plaquetas Obesidad Mieloma múltiple
NBEAL1	ALS2CR16, ALS2CR17	Neurobeachin-like 1	Glioma
NBEAL2	BDPLT4, GPS	Neurobeachin-like 2	Síndrome de plaquetas grises
LRBA	BGL, CDC4L, CVID8, LBA, LAB300	Lipopolysaccharide-responsive, beige-like anchor protein	Inmunodeficiencia común variable Cáncer de próstata Cáncer de mama
WDFY3	ALFY, ZFYVE25	WD and FYVE zinc finger domain containing protein 3	Neurodegeneración
WDFY4	C10orf64, KIAA1607	WD and FYVE zinc finger domain containing protein 3	Lupus eritematoso sistémico
NSMAF	FAN	Neutral sphingomyelinase activation-associated factor	Inmunodeficiencia sutil
WDR81	CAMRQ2	WD repeat domain 81	Síndrome de ataxia cerebral, desequilibrio y retraso mental

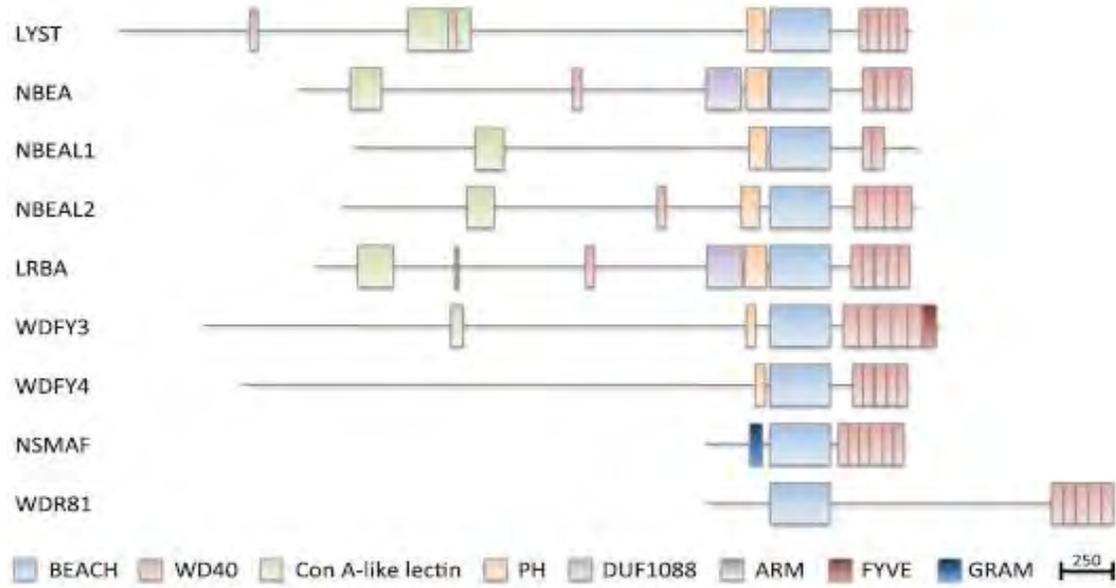


Figura 9. Representación esquemática de las BDCPs. La barra de escala representa 250 aminoácidos con un alineamiento de las nueve proteínas que la conforman. Además de los dominios PH, BEACH y repetidos WD40, comparten la presencia de otros dominios (Tomado de Cullinane et al. 2013).

2.3. ORTÓLOGOS DE LRBA

Desde 2001 Wang y su equipo encontraron ortólogos de Lrba en especies como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y *Homo sapiens* que en todos los casos contienen dos sitios putativos de unión a PKA formando parte de las proteínas de anclaje a cinasa A (AKAPs). Además, encontraron que Lrba tiene homología en su extremo C-terminal con proteínas como LSVA, hFAN y CHS1/BG (Figura 10).

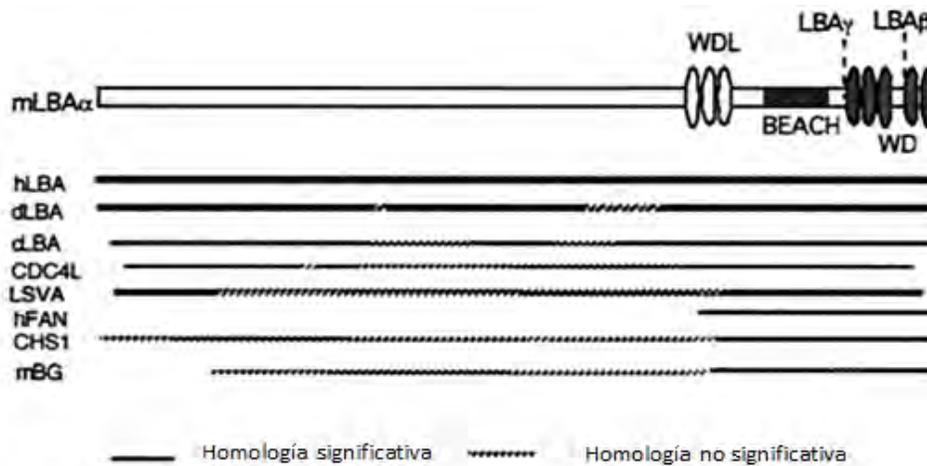


Figura 10. Estructura de Lrba y sus ortólogos. La homología de aminoácidos es diferente dependiendo de la especie donde provenga, siendo el equivalente humano LRBA el que tiene más homología (Editado de Wang et al., 2001).

Actualmente hay información de otros ortólogos, como es el caso de Bph1 en *Saccharomyces cerevisiae*. La eliminación de éste gen causa el incremento de secreción de carboxipeptidasa Y además de una secreción anormal de fosfatasa alcalina. Su ubicación celular es citosólica y de unión a la membrana, mientras que la morfología vacuolar no es afectada por sobreexpresión o falta de Bph1, lo que sugiere que dicha proteína es importante para la secreción de proteínas y formación de pared celular.

En *Caenorhabditis elegans* el ortólogo es sel-2, también conocido como F10F2.1 que es un regulador negativo de lin-12/Notch en precursores vulvares. Cuando se pierde la actividad de esta proteína, hay una acumulación de lin-12/Notch que afecta al tráfico endosomal y a la liberación de proteínas de la superficie celular a los lisosomas.

Las mutaciones en *rg*, ortólogo en *Drosophila melanogaster*, son semi letales en etapas embrionales y las moscas nacidas tienen una baja esperanza de vida y malformaciones severas en los ojos. Esto es causado por apoptosis específica de tipo celular. Interacciona con otros 14 genes incluyendo algunos componentes de las rutas EGFR, Notch, RAS y MAPK.

2.4. UBICACIÓN CELULAR DE LRBA

Las mutaciones en genes como *beige* o *chs1* en la enfermedad de Chediak-Higashi, dan lugar a proteínas truncadas que pierden el dominio BEACH y los repetidos WD ubicados en el C-terminal, lo que lleva a la pérdida de la habilidad de sus productos para asociarse con vesículas intracelulares e influenciar su tráfico celular por lo que, en 2001, Wang y colaboradores utilizaron la región BEACH-WD para construir la proteína BW-GFP y visualizar su localización en la línea celular de macrófagos RAW 267.4 mediante microscopía confocal.

Encontraron que en las células que no fueron estimuladas con LPS, la proteína está presente en el citosol con muy pocas células mostrando un patrón vesicular de tinción. Sin embargo, el patrón de localización vesicular incrementa en gran medida después de la estimulación con LPS (Figura 11A-C). Para determinar en cuál de los compartimentos vesiculares se localiza la BW-GFP, realizaron una tinción específica de lisosomas y aparato de Golgi, dando como resultado una colocalización en ambos componentes (Figura 11D-I).

Además, con microscopía electrónica encontraron que también puede asociarse con retículo endoplásmico, membrana plasmática, retículo endoplásmico perinuclear y vacuolas endocíticas; este hallazgo sugiere que la familia de proteínas WBW puede asociarse con diversos tipos vesiculares y a su vez se puede relacionar con el tráfico vesicular, pero sólo bajo condiciones específicas, por ejemplo, por la estimulación de LPS. Una posible explicación es que la región WBW tiene sitios susceptibles de fosforilación después de ser estimulados por agentes como el LPS.

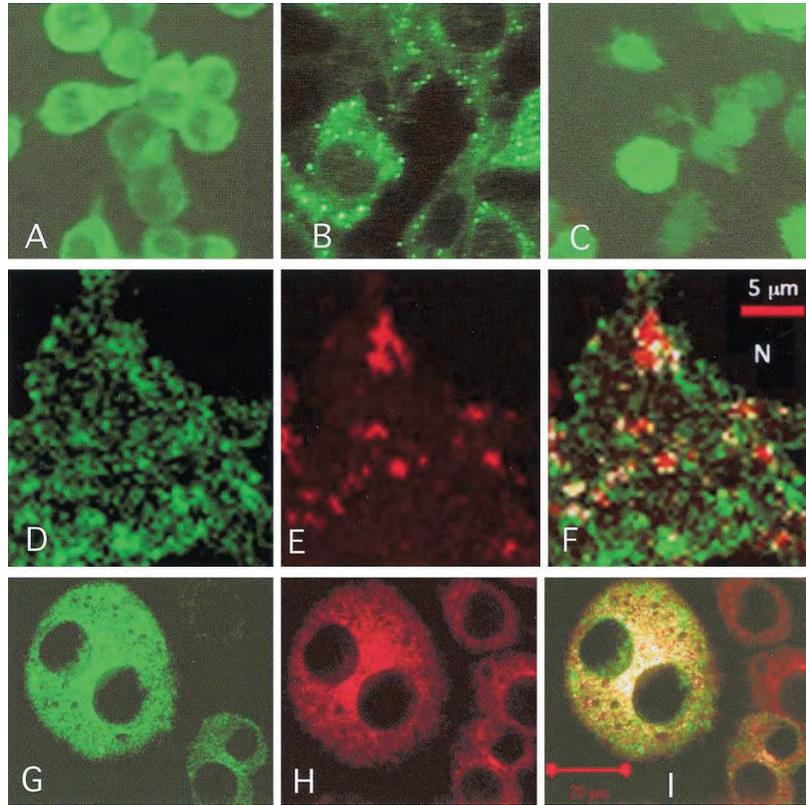


Figura 11. Localización celular de la proteína BW-GFP en macrófagos RAW 267.4. A. Células transfectadas con BW-GFP con fluorescencia citosólica difusa. B. Las mismas células de A cultivadas con LPS (100 ng/mL) por 24h mostrando una extensa asociación a vesículas. C. Células RAW 267.4 transfectadas con el vector control pEGFP-N2 sin aparente asociación a vesículas. C. Macrófago mostrando fluorescencia GFP. D. Mismo macrófago mostrando lisosomas ácidos teñidos. F. Co-localización de proteína BW-GFP con lisosomas (N: núcleo). G-I. Co-localización de proteína BW-GFP con el complejo de Golgi. Todas las células fueron estimuladas con LPS (100 ng/mL) por 24 h, excepto A (Wang et al., 2001).

2.4.1. MECANISMOS DE ACCIÓN PROPUESTOS PARA LRBA

Aunque el mecanismo exacto de Lrba aún es desconocido, desde 2001 se han planteado modelos que se basan en la acción de sus dominios en otras proteínas. En primer lugar, hay uno que propone un funcionamiento de la proteína como respuesta a dos estímulos: el primero es PKA que está unido constitutivamente a Lrba y después de ocurrir una estimulación con LPS el dominio BEACH es fosforilado.

Esto permite que el complejo PKA-Lrba se una a vesículas intracelulares y éstas a microtúbulos que lo transporten a la membrana plasmática. Una vez en la membrana, una segunda señal se requiere para generar cAMP que al unirse a PKA, rompe el complejo PKA-Lrba y PKA es liberado con la finalidad de fosforilar colas citoplásmicas de receptores activados a los que Lrba se une por medio de sus repetidos WD. Éste paso final resulta en la fusión de vesículas con la membrana plasmática (Figura 12).

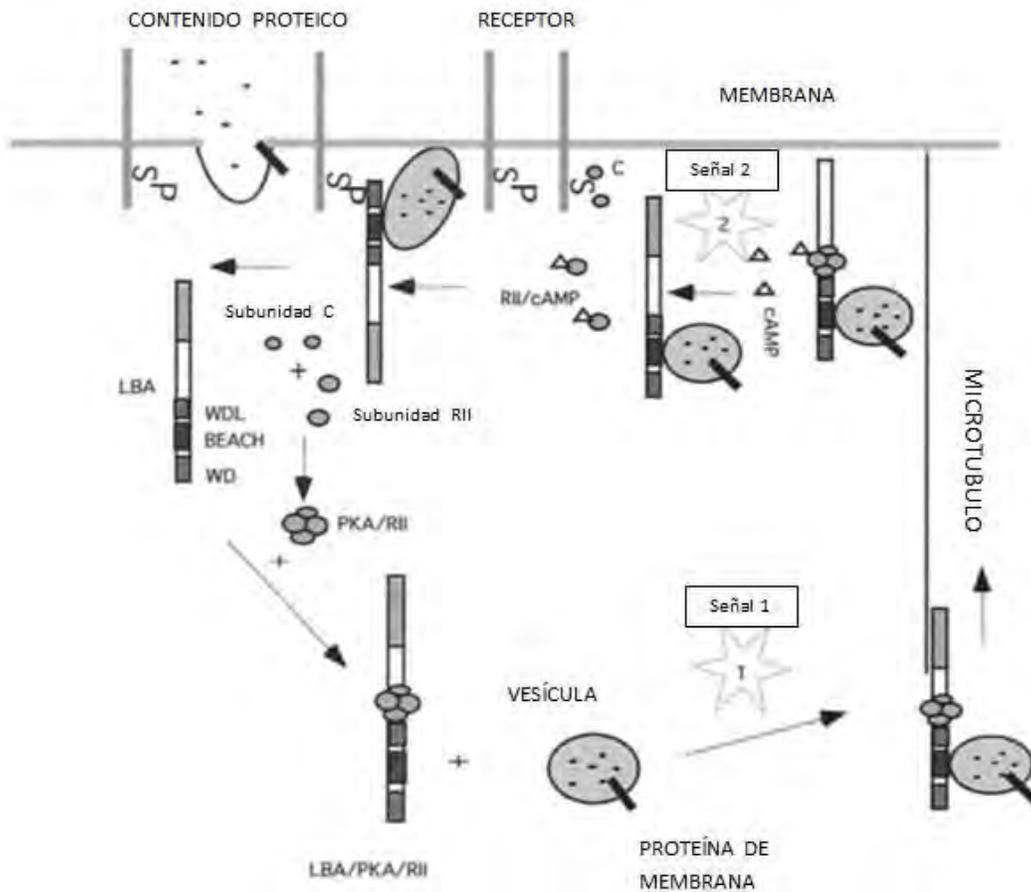


Figura 12. Modelo de secreción vesicular utilizando Lrba como prototipo. (Editado de Wang et al., 2001)

Siguiendo en el marco de la familia de BCDPs, existe otro modelo que toma como prototipos a LYST Y WDFY3 que puede trasladarse a otras proteínas de dicha familia. Plantea el hecho de la especificidad que tienen por el contenido vesicular y la forma en que pueden relacionarse dos BCDPs para lograr comunicación entre dos vacuolas de naturaleza distinta.

Primero cada BCDP reconoce la membrana específica a través de PH y BEACH, posiblemente con ayuda de otros dominios y una vez unidos, pueden interactuar con la BCDP vecina, anclada a otra proteína. Éste andamio actúa como una plataforma de otras proteínas y lípidos que son reclutados para interactuar con BCDPs y/o las membranas vesiculares. Por ejemplo, cuando WDFY3 se une a la membrana del autofagosoma, puede interactuar con p62, lo que facilita a su vez la interacción con las proteínas ATG que tiene una gran importancia en la autofagia de células del sistema inmune (Figura 13) (Cullinane, 2013).

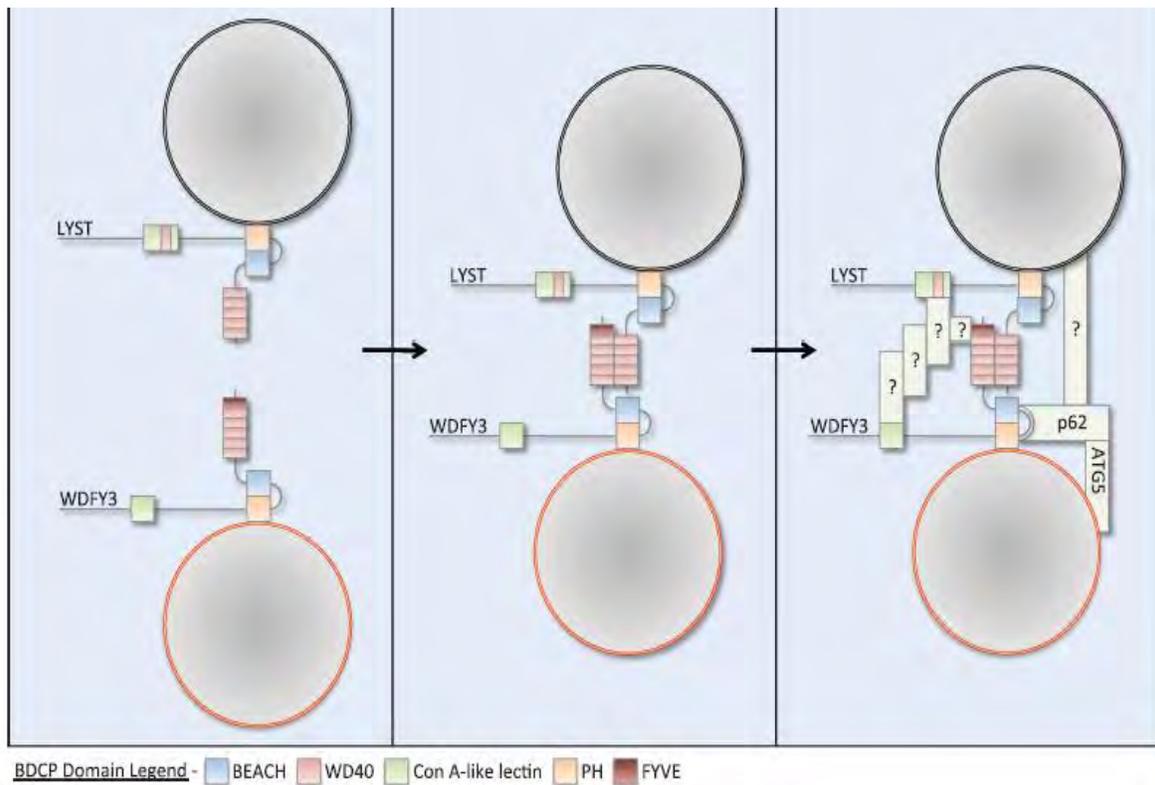


Figura 13. Modelo de interacción entre BCDPs utilizando LYST yWDFY3 como prototipo. En el primer paso, la BCDP se une a su vesícula a través de sus dominios PH-BEACH. Con la ayuda de otros dominios, LYST y WDFY3 pueden interaccionar entre sí, formando un puente entre ambos tipos vesiculares. Por último, esta asociación facilita la participación de otras moléculas importantes en el tráfico vesicular y otros procesos como la autofagia (Cullinane et al., 2013).

2.5. IMPORTANCIA CLÍNICA DE LRBA

A partir del descubrimiento de Lrba, se han realizado muchos estudios sobre la función biológica de dicha proteína y la forma en que podría relacionarse con enfermedades en seres humanos. Actualmente se tiene información muy valiosa que permite asociar tanto el déficit de la proteína, como la sobreexpresión de ésta con enfermedades.

El déficit de LRBA llevar al desarrollo de desórdenes relacionados al funcionamiento del sistema inmune presentándose como inmunodeficiencia común variable (common variable immunodeficiency, CVID), que forma parte de las inmunodeficiencias primarias (por sus siglas en inglés, PID) con defectos de anticuerpos (Cuadro 4). Una PID se define como un defecto genético que influencia el desarrollo y/o la función del sistema inmune (Parvane et al., 2013). La CVID es altamente heterogénea genética, inmunológica y clínicamente, por lo que muchas veces es diagnóstico de exclusión cuando no se cumplen con los criterios para el diagnóstico de otras IDP de anticuerpos. Se tiene registro de doce genes asociados a CVID (Cuadro 5) de los cuales LRBA es el número 8, sin embargo la etiología de cerca del 80% de casos diagnosticados como CVID permanece desconocida (Wang et al., 2014).

Cuadro 4. Distribución de las principales inmunodeficiencias primarias. (Editado de Fuhrman et al., 2011)

Inmunodeficiencia	Porcentaje (%)
Defectos de anticuerpos	54
Defectos celulares	18
Inmunodeficiencias combinadas	7
Defectos en fagocitosis	9
Enfermedades por falla en regulación inmune	3
Defectos del complemento	2
Otros	7

Cuadro 5. Genes asociados a CVID. De acuerdo al número indicado del gen, es la CVID que produce, por lo que LRBA es responsable de la CVID8 (Extraído de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/medgen>).

CVID	Gen	Ubicación cromosómica
1	ICOS	2q33.2
2	TACI	17p11.2
3	CD19	16p11.2
4	BAFFR	22q13.2
5	CD20	11q12.2
6	CD81	11p15.5
7	CR2	1q32.2
8	LRBA	4q31.3
9	PRKCD	3p21.1
10	NFKB2	10q24.32
11	IL21	4q27

CVID8 está caracterizada por deficiencia de anticuerpos (hipogamaglobulinemia) con células B en la periferia, IgA e IgG disminuidas, IgM normal o disminuidos, autoinmunidad y linfoproliferación (Lo et al., 2015 y López-Herrera et al., 2012). Ya que LRBA es una proteína asociada al tráfico vesicular, podría regular otros genes de CVID que son generalmente receptores de membrana celular y a otros factores de autofagia, apoptosis y dinámica membranal (Wang et al., 2014).

En 2012 López-Herrera et al., publican un estudio en el que individuos con hipogamaglobulinemia y autoinmunidad de familias consanguíneas muestran distintas mutaciones homocigotas en el gen *LRBA*, mientras que los familiares con mutaciones heterocigotas no muestran indicios de CVID. Los individuos afectados no expresan la proteína LRBA, tienen fallas en el desarrollo de células B, activación defectuosa de células B *in vitro*, defectos en la formación de plasmablastos y secreción de inmunoglobulinas, y baja respuesta proliferativa.

Es importante conocer la naturaleza de las mutaciones en determinados genes, pues nos aportan información acerca de la función de la proteína, como el caso de los individuos de dicho estudio. Dos de ellos presentaron una sustitución del aminoácido isoleucina por serina en la posición 2657 de la proteína, en donde se localiza el dominio WD40, llevando a la ausencia de expresión de la proteína. Esto sugiere que el aminoácido sustituido es importante para la estabilidad de la proteína ya sea porque participa en el plegamiento de la proteína o

en la interacción con otros componentes, reforzado por el hecho de ser un aminoácido altamente conservado. Otro individuo afectado presentó una mutación en la posición 1683 por un codón de paro prematuro, lo que puede llegar a producir una proteína más corta afectando la expresión de WBW de LRBA, sin embargo, no se encontró la presencia de la proteína. Ocurrió lo mismo con un cuarto individuo, pero el codón de paro en la posición 59 de la proteína; por último, en un quinto individuo la proteína no puede traducirse porque la mutación elimina el sitio de inicio de traducción. Los hallazgos fenotípicos son muy interesantes, pues las células B deficientes de LRBA tienen defectos en el cambio de isotipo, son más susceptibles a apoptosis y tienen autofagia reducida por la acumulación anormal de los organelos.

Los desórdenes en autofagia están relacionados a condiciones autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, así como al tamaño y número de centros germinales en ratones. Otra posible explicación acerca de la autoinmunidad en esta PID fue presentada por Lo et al. (2015) en un estudio realizado a 9 individuos con diagnóstico de CVID y hallazgo de mutaciones no reportadas antes en el gen *LRBA*. Dichos individuos tenían en común la presencia de linfoma de Burkitt y autoinmunidad, incluyendo diabetes mellitus tipo 1, e insuficiencia pancreática exócrina, por lo que fueron tratados con un medicamento llamado abatacept, el cual consiste en una fusión de inmunoglobulina con CTLA4 (Cytotoxic T lymphocyte antigen 4) logrando una mejora significativa. Esto fue de gran interés, pues CTLA4 una molécula presente en linfocitos T que regula negativamente la respuesta inmune por competencia con receptores coestimuladores y se ubica en vesículas endocíticas que posteriormente es expresada en la membrana tras la estimulación con TCR. Por ésta razón, el estudio sugiere que LRBA podría controlar la expresión, función o tráfico de CTLA4 a través de la interacción con dominios como ConA-like, PH y BEACH, por lo que en individuos con déficit o ausencia de LRBA, hay una respuesta inmune descontrolada que lleva a la autoinmunidad.

JUSTIFICACIÓN

Dado que la deficiencia de LRBA se ha relacionado con enfermedades del sistema inmune que se presentan con una frecuencia relativamente alta (Inmunodeficiencia común variable y la autoinmunidad) (Deane et al., 2009). Es importante ampliar las investigaciones que ayuden a comprender el comportamiento de esta enfermedad en las que se incluye el mecanismo exacto de LRBA, pues aún se encuentra desconocido. La CVID presenta, de manera importante, defectos en la respuesta inmune humoral, por lo que resulta interesante determinar si LRBA es expresado en los linfocitos B y bajo qué condiciones. Puesto que no existen anticuerpos dirigidos contra el Lrba de ratón y siendo este un modelo de estudio de fenómenos inmunes, resulta importante determinar si los anticuerpos dirigidos contra el LRBA humano presentan una reacción hacia la proteína de ratón, esto mediante ensayos de Western blot, citometría de flujo y microscopía confocal, con el objetivo de poder estudiar en un futuro la función de esta proteína en el modelo murino.

OBJETIVO GENERAL

Validar el uso de anticuerpos anti LRBA humanos en células B de ratón para utilizarlos en investigaciones que puedan profundizar el estudio de dicha proteína mediante ensayos de citometría de flujo, Western blot y microscopia confocal.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el grado de homología entre los epítomos murinos y humanos reconocidos por los anticuerpos comerciales contra LRBA.
2. Determinar las condiciones apropiadas para detectar la expresión de Lrba en linfocitos B de ratón.
3. Visualizar la localización celular de Lrba en células cultivadas a diferentes tiempos estimuladas con LPS.
4. Determinar la expresión de Lrba en diferentes etapas de maduración de linfocitos B de ratón.

HIPÓTESIS

Si hay homología entre LRBA (proteína humana) y Lrba (proteína murina), entonces sería posible utilizar anticuerpos anti-LRBA para ensayos murinos de expresión de esta proteína.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El procedimiento desarrollado a continuación está basado en trabajos realizados anteriormente por López-Herrera et al., 20012 y Rodríguez-Alba et al., 2008)

DETERMINACIÓN DE LA HOMOLOGÍA DE LOS EPÍTOPOS DE RATÓN Y HUMANOS RECONOCIDOS POR LOS ANTICUERPOS CONTRA LRBA.

El cálculo de la homología se realizó empleando la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias de referencia de la proteína de ratón y humana fueron; ENSMUST00000194674 y ENST00000357115 respectivamente, de la base de datos Ensembl (<http://www.ensembl.org/>). Posteriormente, se seleccionaron los péptidos reconocidos por los tres anticuerpos comerciales utilizados ab193027, ab121601 y 121785, para comparar la homología que hay en dichas posiciones.

A continuación, se detallan las condiciones finales a las que fue posible detectar la expresión de LRBA:

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

- 1.- Se sacrificaron ratones hembra de la cepa C57BL/6J con una edad de 12 a 32 semanas por dislocación cervical, que fueron alimentados nutricubos LabDiet® y agua ad libitum.
- 2.- Se diseccionó el ratón y se obtuvieron los órganos linfoides principales: timo, bazo y médula ósea, colocados en 1mL de PBS estéril a 4°C hasta su manejo en la campana de flujo laminar.
- 3.-Maceración de órganos

- **Maceración de timo:** Después de extraer el órgano, se maceró utilizando un émbolo de jeringa de 5mL en PBS estéril. Posteriormente se centrifugó 524 g por 5 minutos y se retiró el sobrenadante. El pellet se resuspendió en medio RPMI 1640 gibco® suplementado con: 10% suero fetal bovino (Gibco), aminoácidos no esenciales, penicilina, estreptomycin, piruvato de sodio y β-mercapto etanol (todos de Sigma-Aldrich) y se realizó otro lavado. Finalmente se contaron los leucocitos viables en cámara de Neubauer utilizando la tinción negativa con Azul de tripano 0.4% (Sigma-Aldrich®).

- **Maceración de bazo:** Se realizó una incisión en un costado del órgano y se extrajeron las células excluyendo la cápsula, con ayuda de agujas 0.7mm x 32mm en PBS estéril. Posteriormente se centrifugó 524 g por 5 minutos y se retiró el sobrenadante. El pellet se resuspendió y se agregaron 2 mL de buffer de lisis de eritrocitos para ratón (solución de NH₄Cl 0.15 M, KHCO₃ 10 mM, EDTA 100μM). Se agitó por inmersión y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con PBS y después se resuspendió en medio RPMI 1640 gibco® suplementado. Finalmente se realizó conteo de leucocitos viables y ajuste de concentración de células a 20 millones/mL, con RPMI suplementado.

- **Obtención de médula ósea:** Se obtuvieron ambas tibias del ratón, realizando cortes en ambos extremos del hueso. Mediante el uso de una jeringa de insulina, se hizo pasar PBS estéril a través de la cavidad medular. Posteriormente se centrifugó 524 g por 5 minutos y se retiró el sobrenadante. El pellet se resuspendió en medio RPMI 1640 gibco® suplementado. Finalmente se contaron los leucocitos viables en cámara de Neubauer utilizando la tinción negativa con Azul de tripano.

4.- Posterior a la obtención de las células de bazo, se llevó a cabo una técnica de “panning” para el enriquecimiento de células B de esplenocitos de ratón. En placas estériles de 24 pozos, se realizaron diluciones 1:1000 del anticuerpo anti-Thy1 con PBS. Se incubaron por 60 minutos a 37°C y posteriormente se decantó el PBS. Una vez adherido el anticuerpo en el fondo del pozo, se colocaron en cada pozo un total de 10 millones de células, las cuales se

incubaron a 37°C por 30 minutos. Finalmente, se resuspendieron y se realizó el conteo de leucocitos viables.

CULTIVO CELULAR

1.- Se separaron aproximadamente 10 millones de esplenocitos derivados del panning para tinciones destinadas a citometría de flujo y microscopía confocal, y 15 millones de esplenocitos sin panning para Western blot.

2.- Se estimularon linfocitos B enriquecidos por panning en placa de 24 pozos con IL-4 recombinante murina (PeproTech® a una concentración final de 100ng/mL) y LPS (*E.coli* 026:B6 de SIGMA-ALDRICH® a una concentración final de 15µg/mL) y se llevó a volumen final de 1 mL con medio RPMI suplementado. Para la condición sin estímulo (SE), en la misma cantidad de pozos se llevó a volumen final de 1 mL con medio RPMI suplementado únicamente.

3.- Las células destinadas a ensayos de Western blot, se llevó a cabo el mismo procedimiento, pero con un volumen final de 5 mL para cada condición y colocadas en botellas de cultivo.

4.- En el caso de las células de médula ósea, se cultivaron en las mismas condiciones que los esplenocitos, mientras que las células provenientes de timo se cultivaron con anticuerpo anti-CD3.

5.- Finalmente, todas las muestras se incubaron a 37°C por 48 horas en estufa con CO₂ al 5%.

WESTERN BLOT

1.- Preparación de la muestra

- Se cosecharon las células y se retiró el medio de cultivo por centrifugación a 524 g por 5 minutos. El botón celular se resuspendió en 1 mL de PBS y se centrifugó a 524 g por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y las células se almacenaron a -80°C hasta su uso.
- Se descongelaron las células y se les agregó de 50 a 100 μ L de buffer de lisis y se centrifugaron 1179g a 4°C por 10 minutos. Se colectó el sobrenadante y el pellet fue desechado.
- Se determinó la concentración de proteínas mediante construcción de curva patrón y la utilización de reactivo Quick Start™ Bradford Dye Reagent de BIO RAD®. Lectura en espectrofotómetro Epoch de BioTek® a 595 nm.

Se agregó 1 μ L de buffer de carga Laemli (adicionado con β -mercaptoetanol 5%), por cada 5 μ L de volumen de muestra y se colocó en Baño María a 90°C por 5 minutos.

2.- Electroforesis

- Se realizó un gel con tres concentraciones diferentes de acrilamida: 6, 9 y 18%.

	6% (1mL)	9% (2.5 mL)	18% (2.5mL)
Agua grado MiliQ	680 μ L	1.075 mL	325 μ L
Acrilamida	170 μ L	750 μ L	1.5 mL
Tris-HCl 1M pH 6.8	125 μ L	-	-
Tris HCl 1.5M pH 8.8	-	625 μ L	625 μ L
SDS 10%	10 μ L	25 μ L	25 μ L
APS 10%	10 μ L	25 μ L	25 μ L
TEMED	1 μ L	1.5 μ L	1 μ L

- Se colocaron 8 μ L de marcador de peso molecular Spectra Multicolor HR de Thermo Scientific® en un pozo y el volumen correspondiente a 30 μ g de proteína de cada una de las muestras en el pozo correspondiente.

- Se agregó buffer de corrida Tris-glicina-SDS al 5% y se puso en marcha el paso de corriente eléctrica 16 horas a 60V en cámara MiniProtean de BIO-RAD®.

3.- Transferencia

- Una vez transcurrido el tiempo de separación de las proteínas por el campo eléctrico, se incubó una membrana de PVDF Immobilon P de Millipore® en etanol al 70% por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Posteriormente se ensambló el cassette de transferencia, colocando el gel en dirección al cátodo. Se colocó en la cámara de electroforesis y se agregó buffer de transferencia Tris-glicina-isopropanol 5%. Se puso en marcha el paso de corriente eléctrica 4 horas a 60V en cámara húmeda. A partir de este paso, no se permitió que el gel o la membrana se secan.
- Se lavó membrana con TBS-Tween 0.1% 5 minutos en agitación moderada a temperatura ambiente.

4.- Revelado

- Una vez preparada la membrana de transferencia, se procedió a bloquear con solución de leche al 3% (disolvente: TBS-Tween) por 60 minutos en agitación moderada a temperatura ambiente.
- Concluido el tiempo de bloqueo, se colocó la membrana en bolsa de plástico y se agregó 1 µg de anticuerpo anti-human LRBA (ab121601 Novus Biologicals® Littleton CO, USA) usando leche 1% como disolvente. Se selló la bolsa y se incubó 17 horas a 4°C.
- Después de la incubación con el anticuerpo primario anti-LRBA, se realizaron 3 lavados con leche al 1% en agitación, de 10 minutos cada uno.
- Se incubó la membrana por 90 minutos con anticuerpo HRP anti-conejo 1:15000 en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres lavados con leche al 1% en agitación, de 10 minutos cada uno

- Para concluir el revelado, se agregaron 2-3 mL de solución del kit Super Signal® West Femto Maximum Sensivity Substrate de Thermo Scientific a la membrana y se incubó por 60 segundos a temperatura ambiente.
- La lectura fue realizada en fotodocumentador ChemiDoc™ XRS+ System de BIO-RAD® con el software Image Lab™.
- Para revelar la presencia de la proteína constitutiva GAPDH, se realizaron 3 lavados con leche al 1% en agitación, de 10 minutos cada uno. Posteriormente, se colocó la membrana en bolsa de plástico y se agregaron 2.5 mL de anticuerpo anti-GAPDH 1:2000. Se selló la bolsa y se incubó 17 horas a 4°C.
- Posterior a la incubación con el anticuerpo anti-GAPDH, el revelado fue semejante a Lrba utilizando anticuerpo HRP anti-conejo y la solución del kit Super Signal®. La banda de GAPDH se detectó debajo de la banda del marcador correspondiente a 40kDa.

CITOMETRÍA DE FLUJO

- Se cosecharon las células cultivadas y se retiró el medio de cultivo por centrifugación a 524 g por 5 minutos. El botón celular se resuspendió en 1 mL de PBS y se centrifugó a 524 g por 5 minutos.
- Se retiró el sobrenadante y se agregó la solución de bloqueo que consistió en PBS-suero de chivo al 8%. Se incubó 10 minutos a 4°C y se lavó con 1 mL de PBS.
- Se incubaron las células 15 minutos a 4°C en oscuridad con anticuerpos membranales: Anti-Mouse B220 APC (eBioscience, San Diego CA, USA), Anti-Mouse CD21/CD35 PE (eBioscience, San Diego CA, USA), Anti-Mouse CD24 PerCP-Cy5.5 (eBioscience, San Diego CA, USA), Biotinilated Anti-Peanut Agglutinin (Vector laboratorios, Burlingame CA, USA).
- Se agregó 1mL de PBS y se centrifugó a 524g por 5 minutos (lavado). Se retiró el sobrenadante y se incubó el botón celular por 15 minutos a 4°C en oscuridad con PE-CF594 Streptavidin BD Horizon (BD Biosciences, San Jose CA, USA). Al concluir la incubación, se repitió el lavado con PBS.
- Una vez terminada la tinción membranal, se fijaron las células con PBS-Formaldehído 1% por 10 minutos a 4°C y se realizó un lavado con PBS.
- Posteriormente, se permeabilizó la membrana celular con PBS-Triton™ X-100 SIGMA® al 0.03% por 10 minutos a 4°C. Después de esto, se centrifugó a 524g por 5 minutos para retirar el sobrenadante. La solución de PBS-Tritón se utilizó para los siguientes lavados y como diluyente para bloqueo y anticuerpos intracelulares.
- Al concluir la permeabilización, se realizó un segundo bloqueo con una solución de suero de chivo al 5% por 10 minutos a 4°C y se realizó un lavado.
- Se incubaron las células 30 minutos a 4°C con 0.08 µg de anticuerpo anti-Human LRBA (ab121601) y control de isotipo anti-IgG Mouse según corresponda. Al terminar el tiempo de incubación se realizó un lavado.
- Se agregó el anticuerpo secundario Anti-Rabbit FITC 1:900 y se incubó por 30 minutos a 4°C. Posterior a este paso, se hizo un lavado y una segunda fijación con PBS-formaldehído al 1% por 10 minutos.
- Una vez fijadas las células, se llevó a cabo la lectura en citómetro de flujo BD FACSAria™ (Becton-Dickinson) y el análisis en software FlowJo.

- Para determinar la expresión de Lrba en las distintas subpoblaciones de linfocitos B, se diseñó un panel de gráficos (Figura 15):

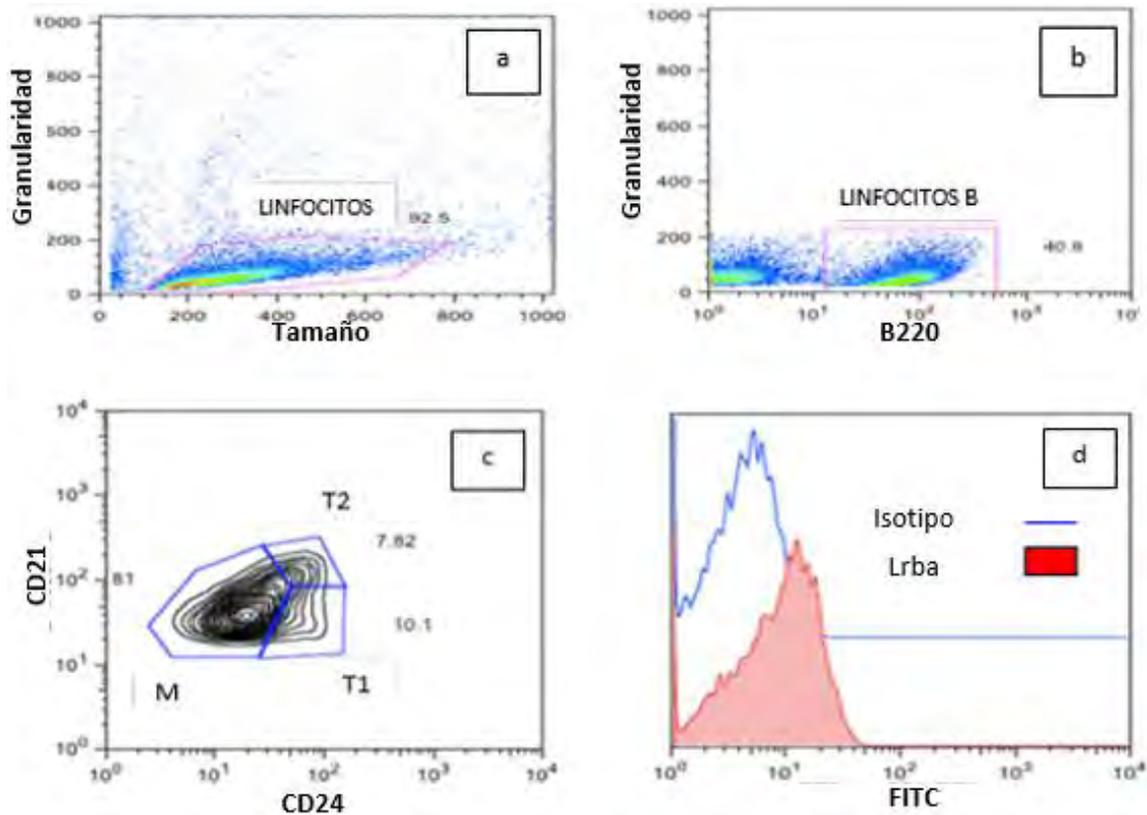


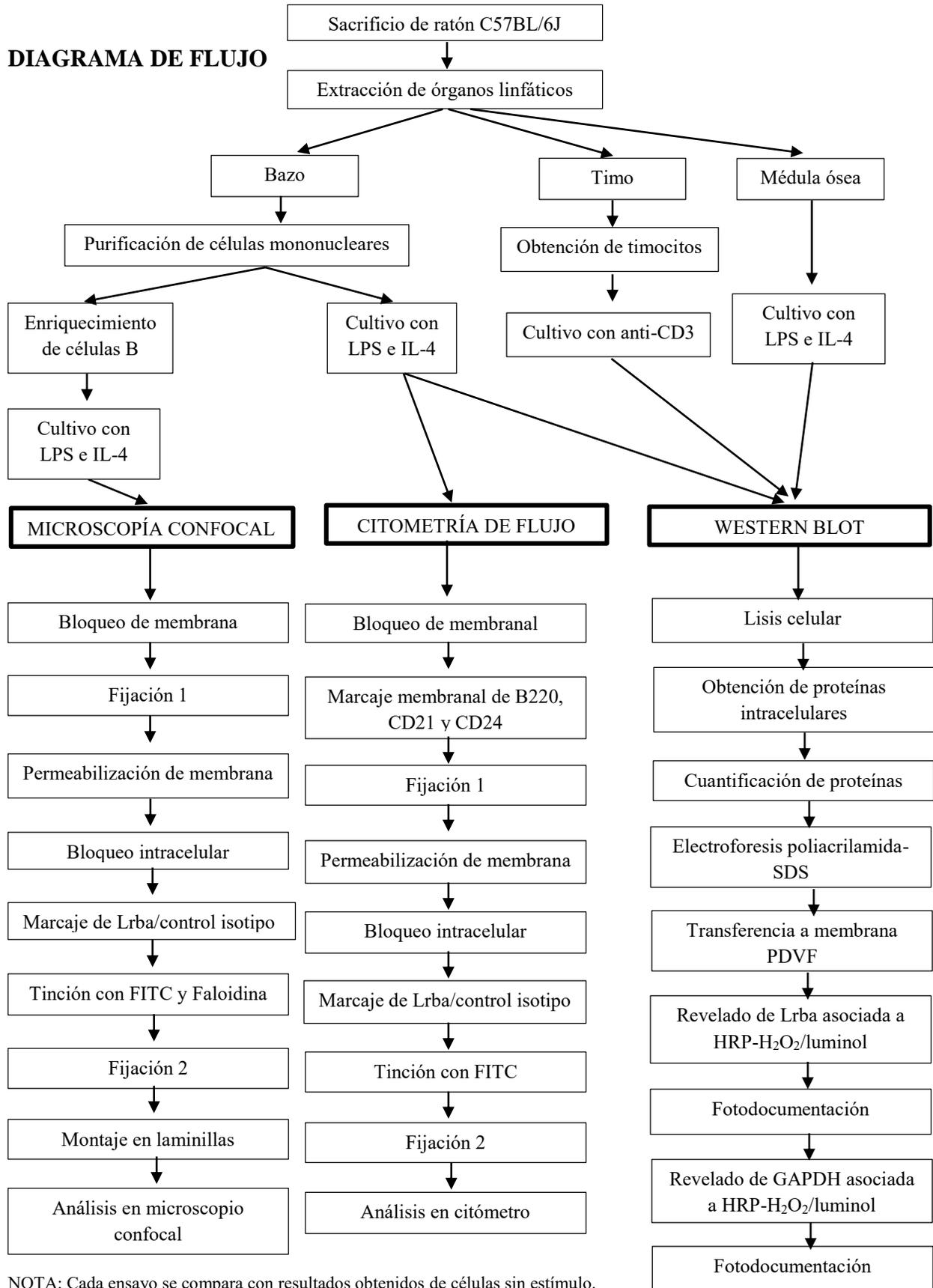
Figura 15. Diseño de panel de citometría de flujo para detección de Lrba en las subpoblaciones de linfocitos B murinos.

- Primero se seleccionaron los linfocitos por tamaño (FSC-A) y granularidad (SSC-A).
- Una vez seleccionados los linfocitos, se consideraron como linfocitos B, las células positivas al marcador B220.
- Los marcadores CD24 y CD21 se utilizaron para clasificar las subpoblaciones de linfocitos B: células T1 (CD24^{hi}, CD21^{low}), células T2 (CD24^{hi}, CD21^{hi}) y linfocitos B maduros (CD24^{low}, CD21^{low}).
- La detección de Lrba se midió por el empalme de los histogramas de FITC (Lrba e isotipo) de cada subpoblación de linfocitos B, además se calculó la intensidad media de fluorescencia para restar Lrba, menos isotipo y así determinar si hubo expresión de la proteína.

MICROSCOPIA CONFOCAL

- Se cosecharon las células cultivadas y se retiró el medio de cultivo por centrifugación a 524 g por 5 minutos. El botón celular se resuspendió en 1 mL de PBS y se centrifugó a 524 g por 5 minutos.
- Se retiró el sobrenadante y se agregó la solución de bloqueo que consistió en PBS-suero de chivo al 8%. Se incubó 10 minutos a 4°C y se lavó con 1 mL de PBS.
- Igual que en citometría de flujo, se fijaron las células con PBS-Formaldehído 1% por 10 minutos a 4°C y se realizó un lavado con PBS.
- Posteriormente, se permeabilizó la membrana celular con PBS-Triton™ X-100 SIGMA® al 0.03% por 10 minutos a 4°C. Después de esto, se centrifugó a 524g por 5 minutos para retirar el sobrenadante. La solución de PBS-Tritón se utilizó para los siguientes lavados y como diluyente para bloqueo y anticuerpos intracelulares.
- Al concluir la permeabilización, se realizó un segundo bloqueo con una solución de suero de chivo al 5% por 10 minutos a 4°C y se realizó un lavado.
- Se incubó toda la noche a 4°C con 3 µg anticuerpo primario Anti-Human LRBA (ab121601) y control de isotipo anti-IgG Mouse según corresponda.
- Al día siguiente, se lavaron las células y se agregaron el anticuerpo secundario Anti-Rabbit FITC 1:900 y Faloidina- rodamina 1:200. Se incubaron por 60 minutos a 4°C y se realizó un lavado.
- Posterior a este paso, se hizo un lavado y una segunda fijación con PBS-formaldehído al 1% por 10 minutos.
- Para fijar las células a la laminilla, se colocaron 50 µL de solución de Poli-L-lisina 0.1% SIGMA® estéril en cubreobjetos de 9x9x0.16 mm y se evaporó en campana. Posteriormente se depositaron 50 µL de la solución celular e incubaron a 37°C 16 horas en estufa con CO₂ al 5%.
- Concluido el tiempo de incubación, se montaron en portaobjetos de vidrio colocando 8 µL de medio de montaje para fluorescencia VECTASHIELD® De Vector Laboratories Inc. Se retiró el exceso de aceite presionando con ayuda de papel absorbente y se selló con esmalte de nitrocelulosa transparente.
- La lectura de las laminillas se llevó a cabo en microscopio confocal FlowView™ 1000 de Olympus® y la adquisición de imágenes con el mismo software.

DIAGRAMA DE FLUJO



NOTA: Cada ensayo se compara con resultados obtenidos de células sin estímulo.

RESULTADOS

- a) Homología de los epítomos reconocidos por los anticuerpos ab193027, ab121601 y 121785.

Como se ha estado mencionando, Lrba y LRBA son proteínas que tienen un gran porcentaje de homología en los aminoácidos que las componen, sin embargo, los anticuerpos que se probaron en el presente trabajo sólo reconocen una serie de aminoácidos cuya longitud va de 131 a 251 aminoácidos. Por ésta razón, se calculó el porcentaje de homología entre los epítomos de LRBA y Lrba que son reconocidos por los anticuerpos mencionados. Esto se calculó en base a un empalme realizado con el programa BLAST entre la proteína murina (ENSMUST00000194674) y humana (ENST00000357115). La secuencia se obtuvo de la base de datos Ensembl (<http://www.ensembl.org/>). Como puede observarse en el gráfico 1, el anticuerpo ab193027 está dirigido contra el péptido formado por los aminoácidos 1 al 251, el ab121601 reconoce el péptido 1541 al 1672, mientras que el ab121765 reconoce de 907 a 1038. Las regiones reconocidas por estos anticuerpos, presentan una homología de 96.9, 71.2 y 63.1% en cuanto a su secuencia de aminoácidos (Gráfico 1)

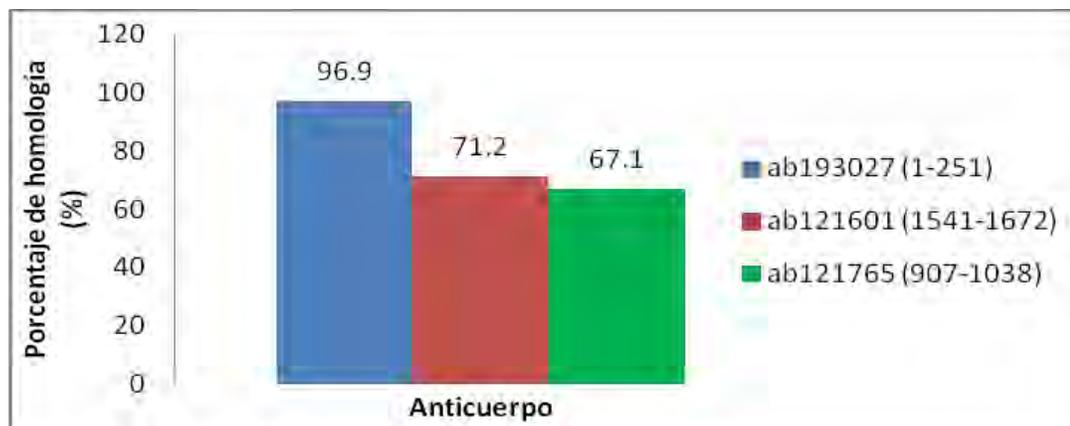


Gráfico 1. Porcentaje de homología entre los epítomos de LRBA y Lrba reconocidos por los anticuerpos utilizados. Como se puede apreciar, el epítomo en donde hay un mayor porcentaje de homología, es el reconocido por el ab193027, sin embargo, el que mostró mejores resultados fue ab121601.

b) Alineamiento de los aminoácidos que conforman los inmunógenos de cada anticuerpo utilizado

A continuación, se presenta el alineamiento de los aminoácidos correspondientes a los péptidos que reconocen los anticuerpos utilizados. Como se mencionó en el inciso anterior, las secuencias de humano y ratón se obtuvieron de la base de datos Ensembl y posteriormente, se alinearon con el programa de BLAST protein-protein en la página <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Los datos se agrupan cada tres renglones, indicando a los extremos, la posición de los aminoácidos; en el primer renglón de cada grupo se indica en negritas, la secuencia correspondiente al ratón; en el segundo renglón, se indican los aminoácidos que son idénticos entre las dos secuencias (el signo + indica que hay un cambio de aminoácido, pero que su naturaleza química es similar, por lo que podrían actuar de manera semejante); finalmente, en el tercer renglón, está subrayada la secuencia correspondiente al humano. En color azul, se destacan los aminoácidos prolina (P), mientras que, en rojo, se destacan los aminoácidos aromáticos: fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W), por su designación en letras. La proporción de aminoácidos aromáticos en cada secuencia, fue similar en los tres péptidos, mientras que hay dos residuos de prolina en la secuencia correspondiente al humano, reconocida por el Ab121601.

Ab193027 (1-251)

Ratón 1	MASEDNRAPSRPPTGDDGGGGGKEETPTEGGALSLKPGLPIRGIRMKFAVLTGLVEVGEV	60
	MASEDNR PS PPTGDDGGGGG+EETPTEGGALSLKPGLPIRGIRMKFAVLTGLVEVGEV	
Humano 1	<u>MASEDNRVSPPTGDDGGGGGREETPTEGGALSLKPGLPIRGIRMKFAVLTGLVEVGEV</u>	<u>60</u>
Ratón 61	SNRDIVETVFNLLVGGQFDLEMNFIIQEGESIMCMVELLEKCDVTCQAEVWSMFTAILKK	120
	SNRDIVETVFNLLVGGQFDLEMNFIIQEGESI CMV+LLEKCD+TCQAEVWSMFTAILKK	
Humano 61	<u>SNRDIVETVFNLLVGGQFDLEMNFIIQEGESINCMVDLLEKCDITCQAEVWSMFTAILKK</u>	<u>120</u>
Ratón 121	SIRNLQVCTEVGLVEKVLGKIEKVDSMIADLLVDMGLVLSYNLTVRELKLFSSKLQGDK	180
	SIRNLQVCTEVGLVEKVLGKIEKVD+MIADLLVDMGLVLSYNLTVRELKLFSSKLQGDK	
Humano 121	<u>SIRNLQVCTEVGLVEKVLGKIEKVDNMIADLLVDMGLVLSYNLTVRELKLFSSKLQGDK</u>	<u>180</u>
Ratón 181	GQWPPHAGKLLSVLKHMPQKYGPDAFFNFPKGSAAAIALPPIARWPYQNGFTFHTWLRMD	240
	G+WPPHAGKLLSVLKHMPQKYGPDAFFNFPKGSAAAIALPPIA+WPYQNGFTFHTWLRMD	
Humano 181	<u>GRWPPHAGKLLSVLKHMPQKYGPDAFFNFPKGSAAAIALPPIAKWPYQNGFTFHTWLRMD</u>	<u>240</u>

Ratón 241 PVNNINVDKDK 251

PVNNINVDKDK

Humano 241 PVNNINVDKDK 251

Ab121735 (907-1038)

Ratón 907 GGWRVWVDTLSITHSKVTFEIHKENLANIFREEQRKGDEETGPCSSSLVPEGTG 960

GGWRVWVDTLSITHSKVTFEIHKENLANIFRE+Q K DEE G CSS+ V +G

Humano 907 GGWRVWVDTLSITHSKVTFEIHKENLANIFREQQGKVDEEIGLCSSTSVQAASG 960

Ratón 961 ATRGVDVSVGSQHEDRKDSPISPHFTRNSDENSSIGRASSIDSASNTELQTHDMSDEKK 1020

R ++VSVGSQ D KDSP+ PHFT N +ENSSI + SS++SASN ELQT + S +E K

Humano 961 IRRDINVSVGSQQPDTKDSPVCPHFTTNGNENSSIEKTSSLESASNIELQTTNTSYEMK 1020

Ratón 1021 VERENQELLDQATVEETA 1038

E+ENQEL D+ T+EET

Humano 1021 AEQENQELPDEGTLEETL 1038

Ab121601 (1541-1672)

Ratón 1541 VLMVSKYRDILEPQD 1555

VLMVSKYRDILEPQ+

Humano 1542 VLMVSKYRDILEPQN 1556

Ratón 1556 ERHSQSLKETSSDNGNASLPDAENTPAEFSSLTLSVVEESLEGTSCTRRRDSGLGEETAS 1615

ERHSQS ET S+N N SL +E TPA FS+LT ++ E E TS RRRDSG+GEETA+

Humano 1557 ERHSQCTETGSENVSL--SEITPAAFSTLT-TASVEESESTSSARRRDSGIGEETAT 1613

Ratón 1616 GLGSGLSVASPAAPLGVSAGPDAISEVLCTLSLEVNKSQETRIDGGNELDRKVTPSV 1672

GLGS + V AP GVSAGPDAISEVL TLSLEVNKS ET+ D GN+LD K TPSV

Humano 1614 GLGSHVEVTPHTAPPVGSAGPDAISEVLSTLSLEVNKSPEKNDRGNDLDTKATPSV 1670

c) Localización de las secuencias reconocidas por los anticuerpos utilizados

Para conocer la ubicación de epítipo reconocido por los anticuerpos utilizados, se esquematiza la estructura de la secuencia de la proteína, extraída de la base de datos Ensembl predicha para *Mus musculus* y en la parte de abajo para *Homo sapiens*. A. ab193027 reconoce el extremo N-terminal de la proteína, B. ab121765 reconoce un fragmento del dominio Con-A like y C. ab121601 que reconoce una secuencia que aparentemente no pertenece a un dominio en particular.

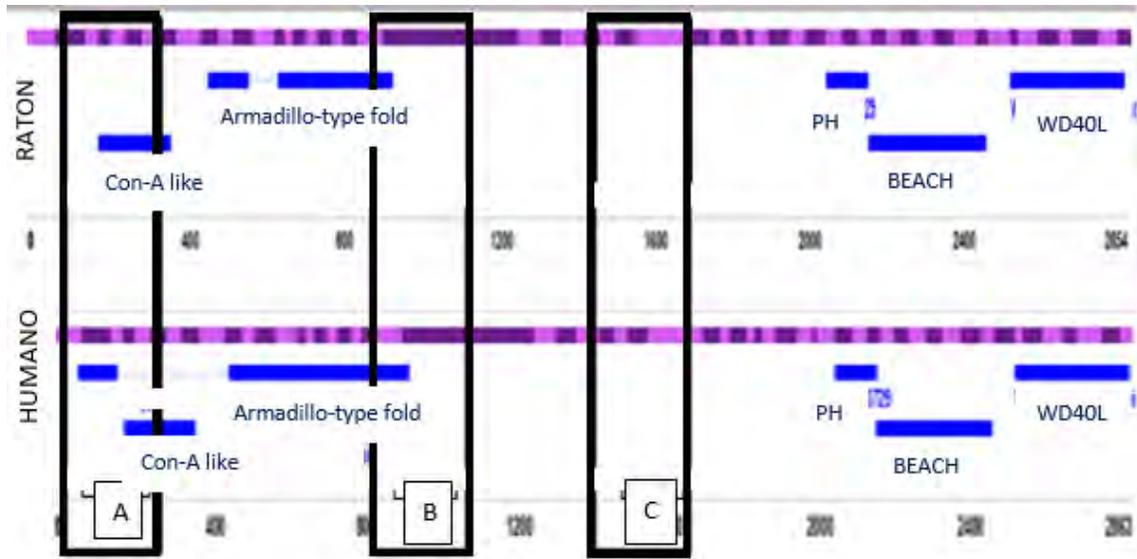


Figura 16. Localización de las secuencias reconocidas por los anticuerpos utilizados (inmunógenos)

d) Expresión de LRBA en diferentes tejidos por medio de Western-Blot

Como se mencionó en la sección de procedimientos experimentales, se obtuvieron lisados celulares de bazo, timo y médula ósea. Al realizar el WB en todos estos lisados observamos una banda única aproximadamente 200 kDa en estas muestras únicamente con el anticuerpo ab121601 (Figura 17A) mientras que no hubo ningún reconocimiento con el anticuerpo ab193027 (datos no mostrados). De manera adicional, la presencia de la banda de 200kDa se observó con una intensidad mayor en muestras de médula ósea después del estímulo con LPS-IL4 y también se expresa en las células obtenidas de timo Finalmente, y de manera interesante, esta banda se observó en condiciones *ex vivo*.

En la Figura 17B se muestran resultados obtenidos anteriormente a este trabajo, en el que se aprecia la presencia de Lrba en diferentes órganos con funciones no linfáticas. En órganos como cerebro, hipocampo e hígado existe más de una banda reconocida por el ab121601

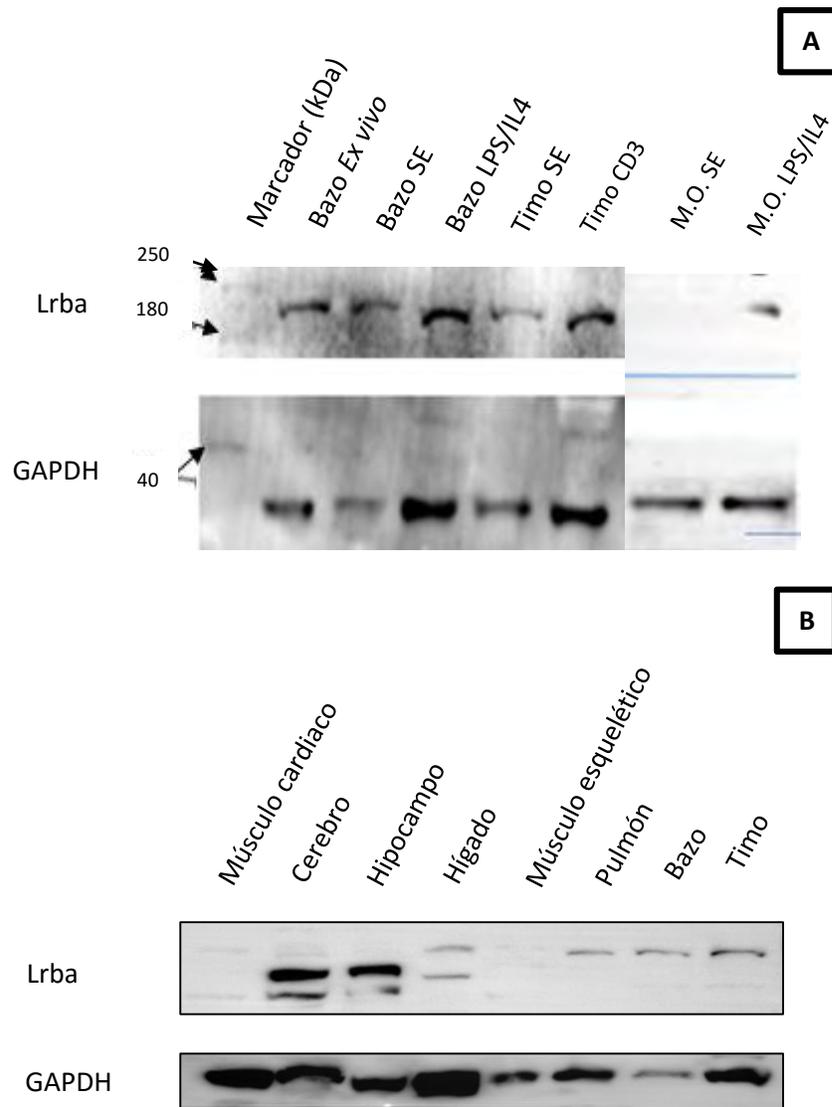


Figura 17. Western blot de Lrba en órganos de ratón. A. Órganos linfoides de ratón C57BL/6J con y sin estímulo. Todas las muestras fueron cultivadas por 24 horas, excepto bazo Ex vivo. Se considera Lrba como el fragmento ubicado entre la banda de 250 y 180 kD. B. Órganos con diferentes funciones fisiológicas provenientes de ratón C57BL/6J, sin estímulo. En ambas figuras se muestran las bandas reconocidas por el ab121601 comparadas con la banda correspondiente a GAPDH.

e) Determinación de la expresión de Lrba por citometría de flujo

Al inicio de los ensayos experimentales, se emplearon diversas condiciones para detectar Lrba por citometría de flujo. Como puede observarse en la figura 21, el uso de saponina como agente permeabilizador y la utilización de suero de ratón como solución de bloqueo, no favoreció la detección de Lrba ni en citometría de flujo, ni en microscopía confocal. Además, con ésta tinción, se midió la expresión de la proteína a 24, 48 y 72 horas, sin mostrarse una diferencia visible en la fluorescencia de FITC (Figura 18). Otro aspecto que se modificó, fue la disminución en la concentración el anticuerpo secundario (FITC) para evitar el fondo proporcionado por éste fluorocromo (Figura 19). Una vez obtenidos los resultados por triplicado de ésta tinción inicial, se graficaron los resultados (Gráfico 2), en los que se puede observar que la dispersión de los datos obtenidos es muy amplia, por lo que se continuaron realizando modificaciones a la técnica.

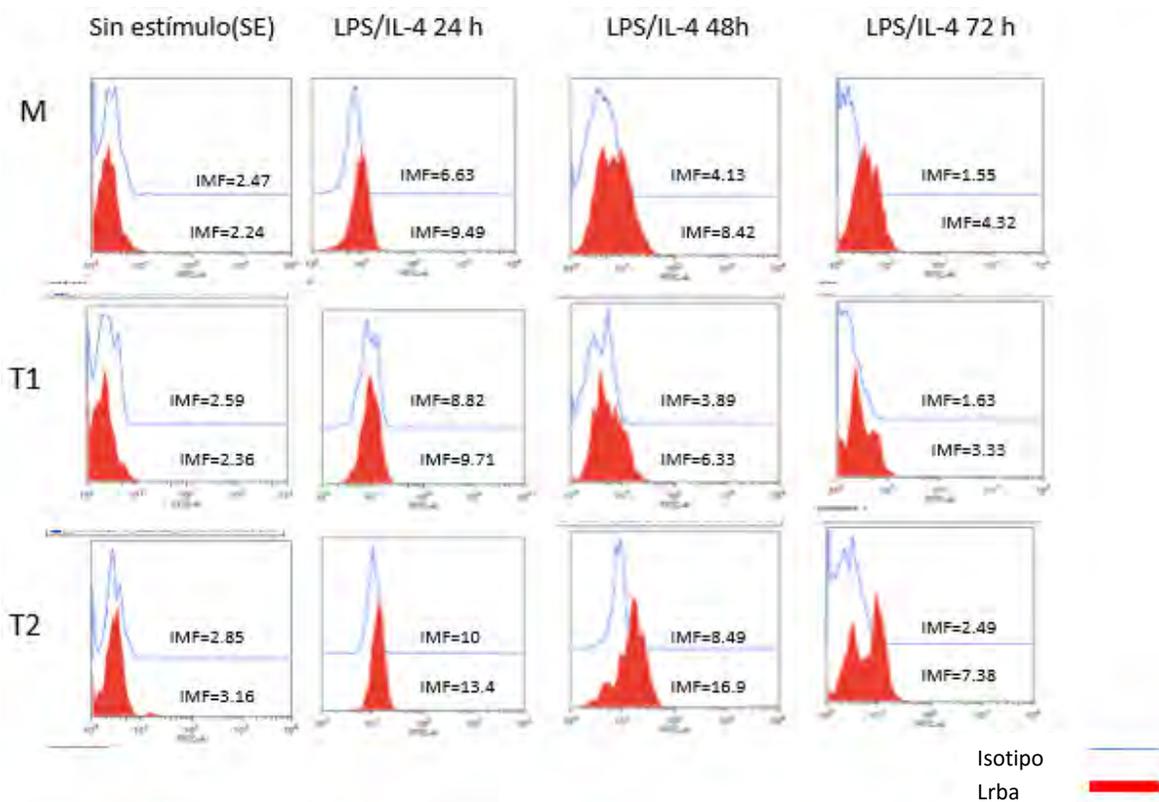


Figura 18. Citometría de flujo con la tinción inicial. A. Se muestran los histogramas referentes a Lrba-Isotipo de los linfocitos B maduros (M), transicionales 1 (T1) y transicionales 2 (T2) no estimulados y a 24, 48 y 72 horas de estimulación con LPS/IL-4

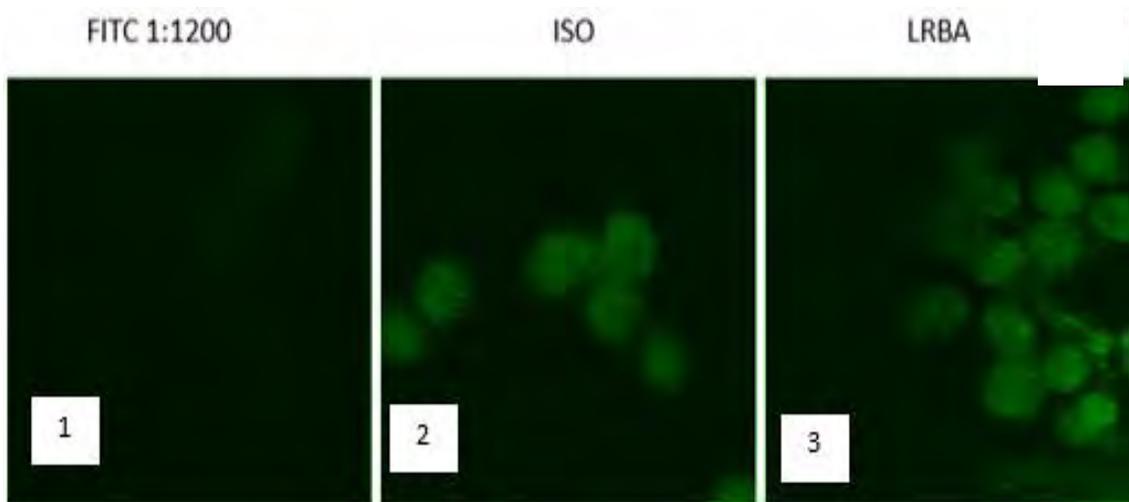


Figura 19. Microscopía confocal con la tinción inicial. 1. Microscopía confocal de linfocitos murinos teñidos únicamente con Anti-rabbit FITC 1:1200, 2. Isotipo y 3, LRBA. En todos los casos se utilizó el anticuerpo ab121601, la solución de bloqueo fue suero de ratón 10%, permeabilización con saponina 0.1%. No se utilizó ningún marcador extra y sólo se incubó el anticuerpo primario por 60 minutos.

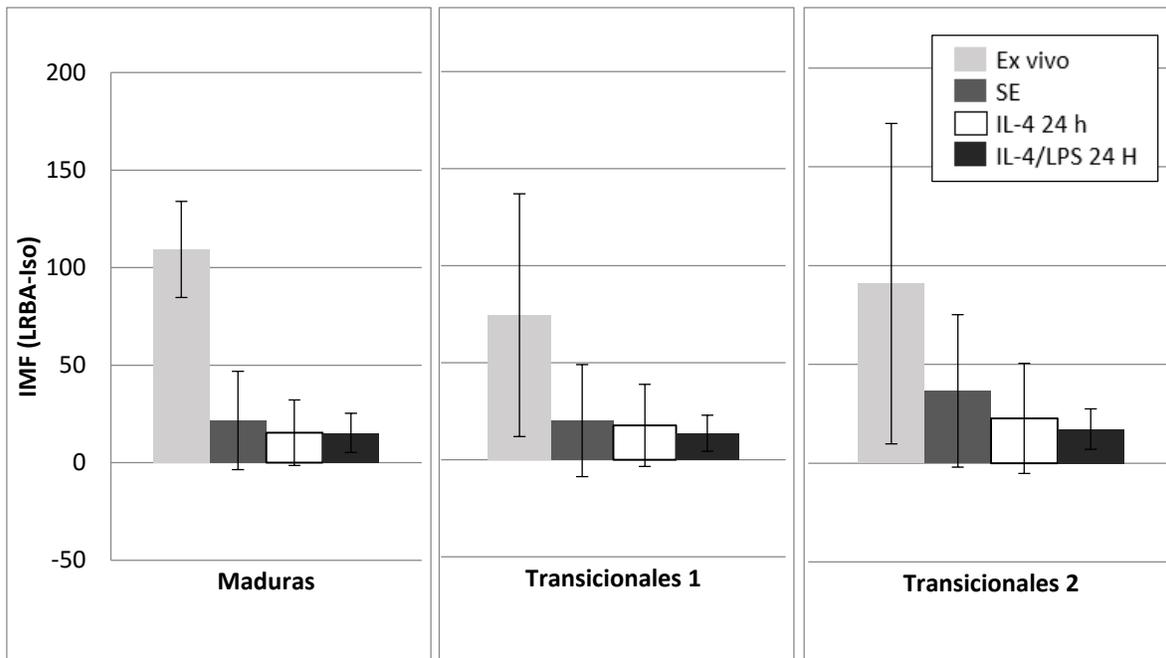


Gráfico 2. Resultados estadísticos de detección de Lrba con la tinción inicial. Se graficó el promedio del resultado de restar la intensidad media de fluorescencia (IMF) de Lrba menos Isotipo en las muestras Ex vivo y cultivadas por 24 horas SE, LPS/IL-4 y IL-4. Se muestra con las barras verticales, la dispersión de los datos (n=3).

De manera general, las modificaciones realizadas a la tinción estuvieron enfocadas a tres partes: a nivel del bloqueo, permeabilización de las células y la concentración del anticuerpo anti-LRBA conjunta al control de isotipo. Además de la solución bloqueadora descrita en el procedimiento experimental, se probaron soluciones de suero de ratón y humano, así como el suero de chivo en una concentración de 10%.

En cuanto a la solución permeabilizadora, se hicieron ensayos con saponina y con tritón al 1%. Finalmente, la concentración del anticuerpo primario se ajustó porque al comprar un nuevo lote de anticuerpo, la concentración señalada por el fabricante fue mayor a la encontrada por cuantificación espectrofotométrica realizada en el laboratorio, por lo que se aumentó para favorecer la lectura en cada técnica.

Una vez que se encontraron las condiciones favorables para detectar Lrba en linfocitos B de ratón (panel izquierdo de la Figura 20), se prosiguió a probar la eficiencia de distintos anticuerpos para detectar la expresión de la proteína en células estimuladas con IL-4 y LPS. Como se observa en el panel derecho de la misma figura, el anticuerpo que proporcionó una mayor señal de fluorescencia, fue el ab121601 a pesar de que en teoría el ab193027 reconoce una secuencia con mayor homología entre LRBA y Lrba.

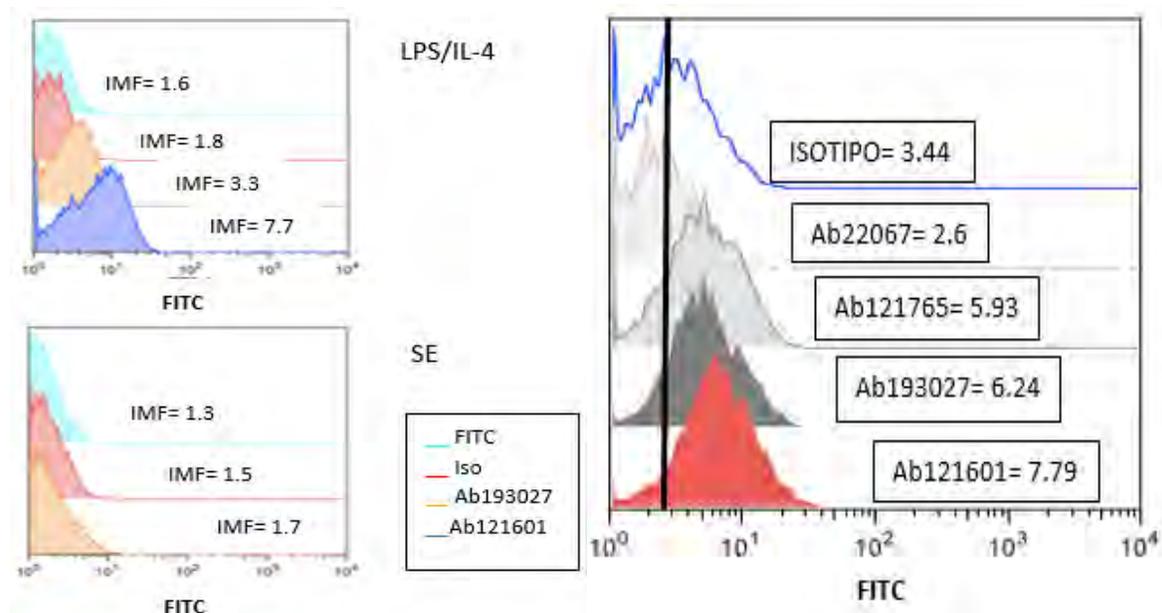


Figura 20. Histogramas de tinción final en citometría de flujo. En el panel de la izquierda se presentan linfocitos B cultivados por 48 horas con y sin estímulo, notándose una diferencia visible entre la IMF de isotipo (azul celeste) y ab121601 (azul rey). A la derecha se muestran los resultados de linfocitos B al utilizar cuatro anticuerpos diferentes. NOTA: La tinción final es la que se indica en el procedimiento experimental.

Debido a la heterogeneidad en las células tras ser cultivadas con LPS e IL-4 (Figura 21A) y para comprobar que las células que expresan mayor cantidad de Lrba están activadas, se utilizó PNA, que es una lectina que se adhiere a receptores membranales expresados en células activadas. Se analizaron de forma separada los linfocitos grandes y pequeños (Figura 21B), con lo que se encontró que los primeros son los que tienen fenotipo activado (Figura 21C). Posteriormente se evaluó la expresión de Lrba ambas poblaciones, encontrando que las células activadas son las que expresan mayor cantidad de dicha proteína (Figura 21D).

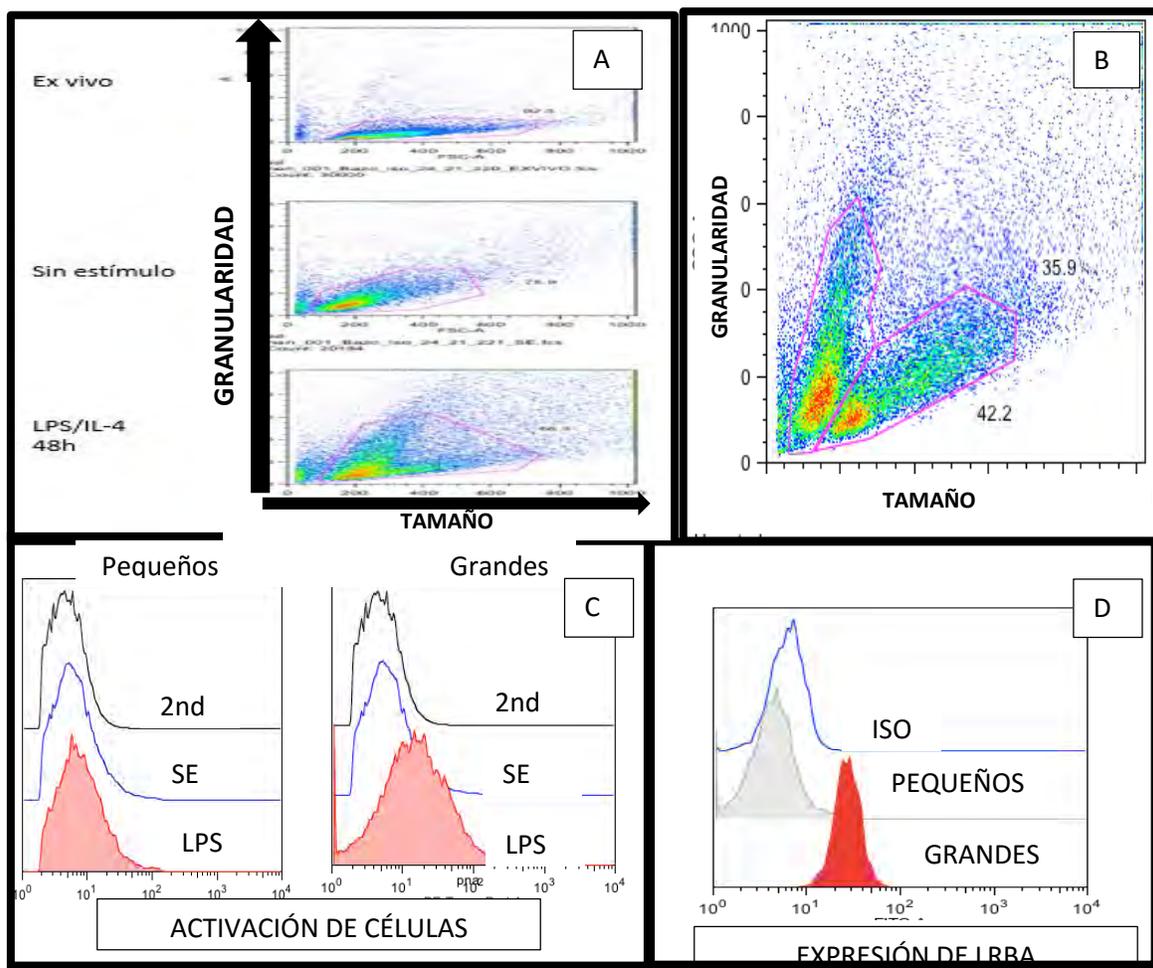


Figura 21. Utilización de PNA como marcador de activación. A. Tamaño y granularidad de linfocitos Ex vivo, SE y LPS/IL-4. B. Poblaciones de linfocitos cultivados con LPS e IL-4 seleccionadas para evaluar su activación. C. Activación de linfocitos B220+ de acuerdo a su tamaño. D. Evaluación de Lrba en linfocitos B220+ activados y no activados.

f) Expresión diferencial de Lrba

Una vez realizados los experimentos por triplicado, con ésta técnica la dispersión de los datos es menor y fue posible destacar que hay un aumento significativo de Lrba en los linfocitos B cultivados con LPS e IL-4, en comparación a los que no fueron estimulados. Por otro lado, en las células T1 hay una disminución significativa de Lrba al ser cultivados sin ningún estímulo, mientras que en las células B maduras hay también un aumento significativo de Lrba al ser activadas con LPS e IL-4. Lo mencionado se representa en el Gráfico 3 (explicado en la página siguiente).

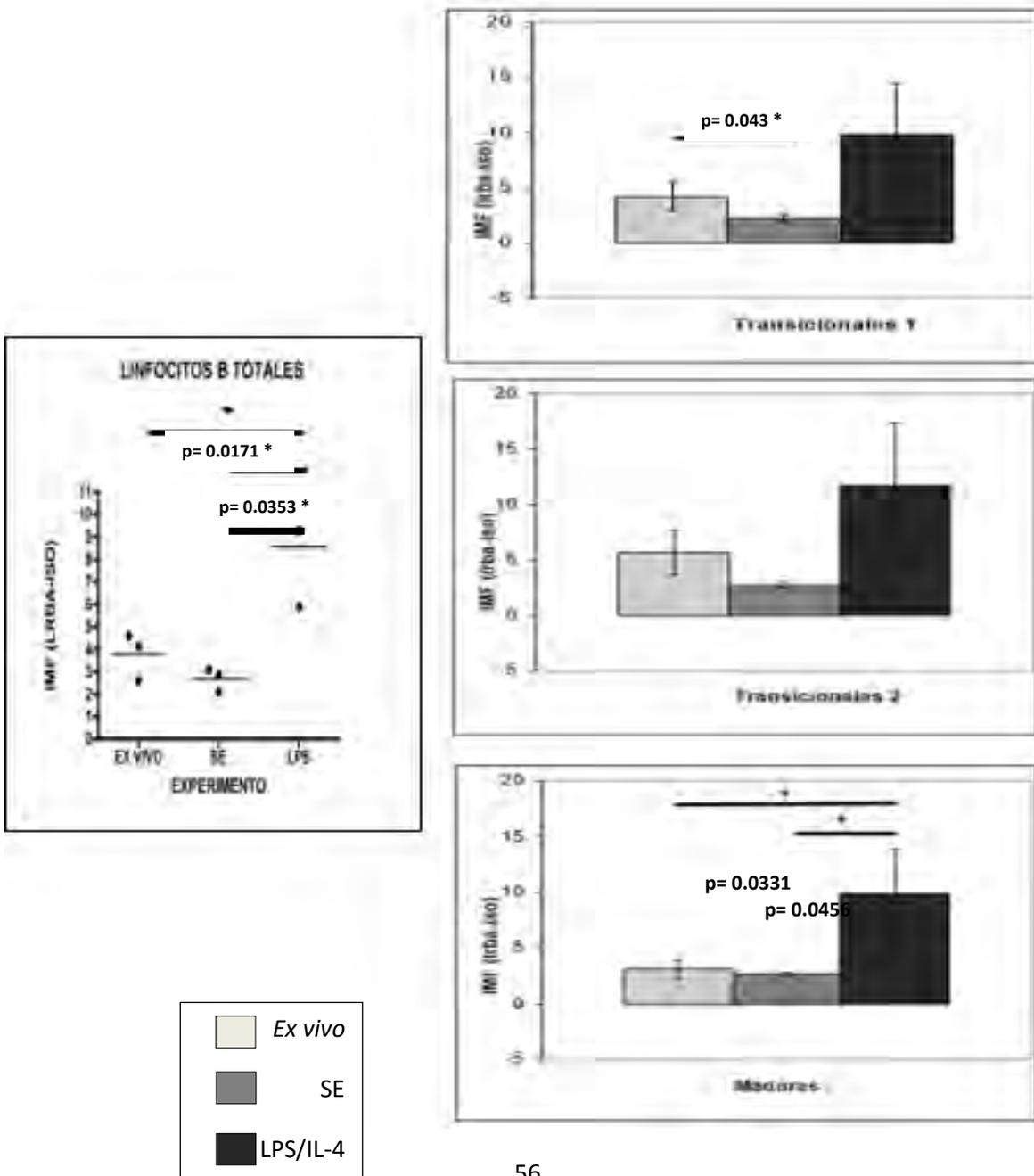


Gráfico 3. Expresión de Lrba en linfocitos B murinos cultivados 48 horas. En linfocitos B totales, hay un aumento significativo de Lrba cuando son estimulados con LPS, respuesto a SE y *Ex vivo*. En cuanto a los estadios de diferenciación, las células maduras son las que muestran una diferencia más visible. En las células transicionales 1 se observa una disminución significativa en los SE con respecto a *Ex vivo*. Se utilizó la prueba de t de student para determinar la significancia en este ensayo, con un intervalo de confianza de 95%, por lo que son marcados con un asterisco (diferencia discreta) sólo se indican los valores de los ensayos que tienen una $p > 0.05$ (n=3).

g) Evaluación de Lrba mediante microscopía confocal

Adicional al ajuste en la concentración de los anticuerpos primarios, en la solución de bloqueo y de permeabilización, se utilizó la técnica de panning y el marcaje con faloidina-rodamina, con la finalidad de provocar que las células vistas en el microscopio confocal fueran en su mayoría linfocitos B. Como se observa en la parte superior de la figura 22, el porcentaje de células B en la muestra elegida para esta técnica, aumenta a más del doble por lo que prácticamente se elimina la posibilidad de encontrarse con un linfocito T gracias a la técnica de enriquecimiento por panning. En la parte de debajo de la figura se muestra la eficiencia del marcador de Faloidina-rodamina para visualizar células que están íntegras y que de esa forma no se tomen en cuenta las células que están dañadas o muertas.

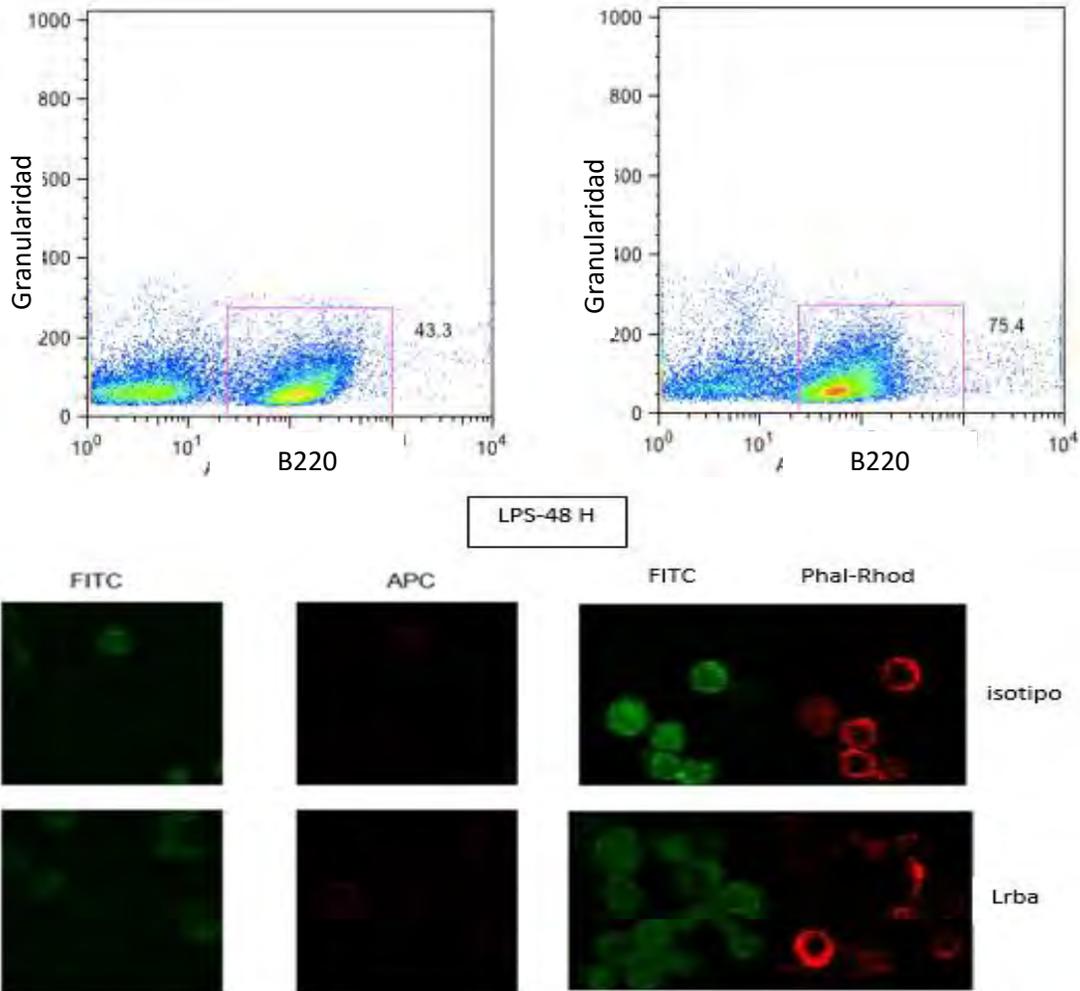


Figura 22. Mejoras realizadas a la técnica de microscopía confocal. En la parte de arriba se muestran los resultados del panning de células B con lo que se logra aumentar más del doble de linfocitos B totales en la muestra. En la parte de abajo se resalta la ventaja del uso de faloidina rodaminada (Phal-Rhod) frente a B220 (APC) como marcador de células íntegras.

A pesar de que la concentración de los anticuerpos primarios se aumentó en ésta técnica, así como el tiempo de incubación de los mismos, en la figura 23 se muestra que aunque se observa una expresión tenue de Lrba, la intensidad de la misma no permite apreciar diferencias importantes a las observadas en el control de isotipo.

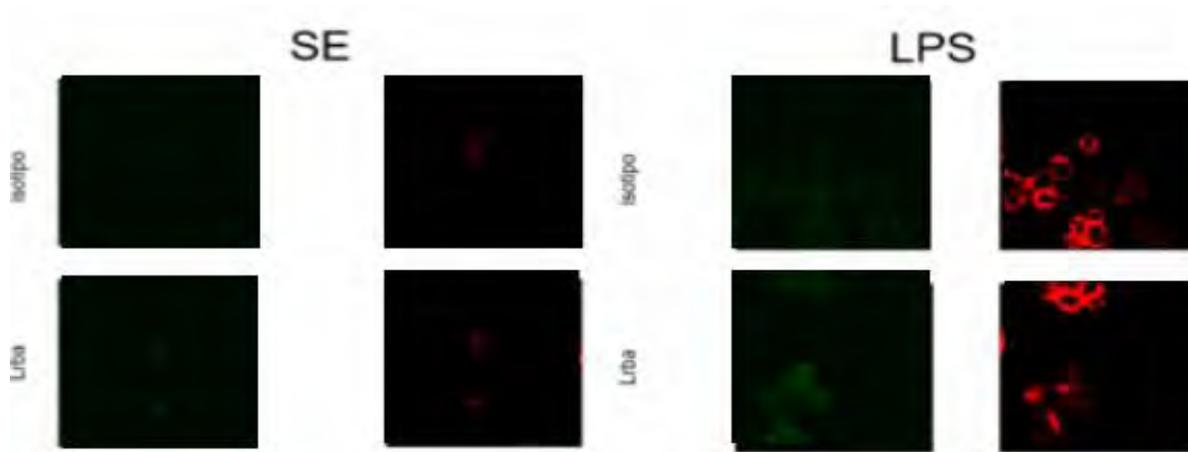


Figura 23. Tinción final para microscopía confocal en linfocitos B murinos. En verde se representa la fluorescencia de FITC y en rojo la de Faloidina-Rodamina. Linfocitos provenientes de ratón de 18 semanas de edad. La tinción final es la descrita en el procedimiento experimental.

h) Ensayos realizados en células de humano

Para validar la utilidad de la citometría de flujo en la detección de Lrba, se realizaron tinciones en células humanas, empleando las mismas concentraciones de anticuerpo y tiempos de incubación empleadas para la detección de esta proteína en células de ratón. En este caso se empleó el anticuerpo ab121765. Como puede observarse en el Gráfico 4 de linfocitos T, la tinción con este anticuerpo fue eficiente. Gracias a éstos resultados se puede decir que la expresión de LRBA se puede detectar adecuadamente tras la activación con fitohemaglutinina y CD3/CD28 un buen activador en células T humanas. En el caso de linfocitos B, si se puede detectar la expresión de LRBA, pero al parecer la IgM como activador de éstas células, no funcionó eficientemente. Por último, se probó el ab121601 en fibroblastos humanos por microscopía confocal (Figura 24), con el que se obtuvieron resultados favorables pues en las células provenientes de un sujeto sano hay una fluorescencia mayor que en los fibroblastos provenientes de un individuo con CVID deficiente de LRBA.

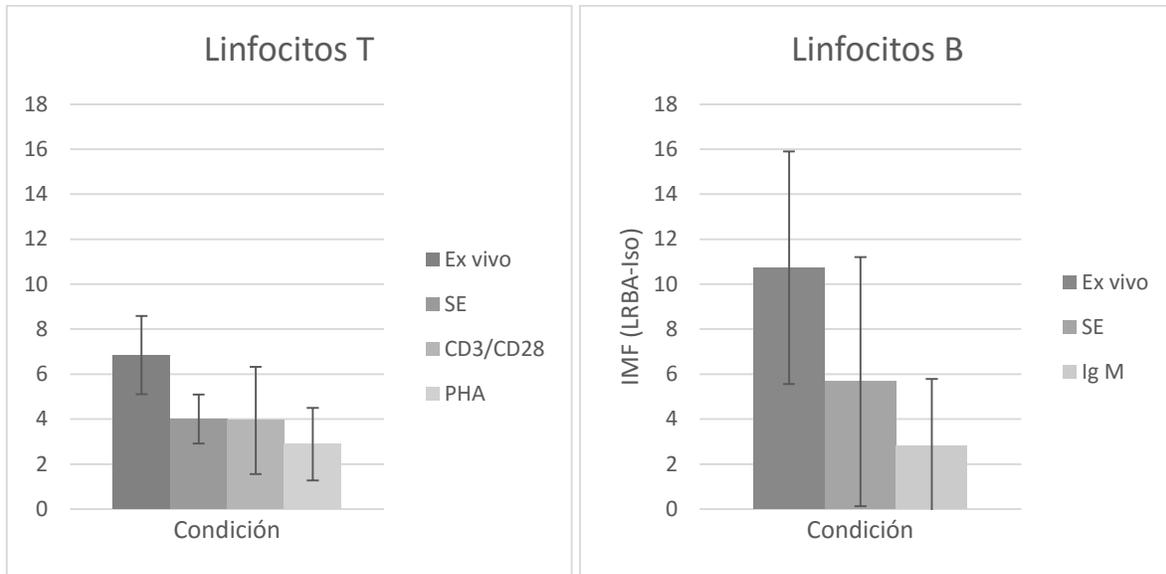


Gráfico 4. Expresión de LRBA en linfocitos humanos testigo. Representación estadística de la expresión de LRBA en linfocitos B de sangre periférica, tras ser estimulados con IgM y linfocitos T estimulados con CD3 y CD28 o PHA(n=3).

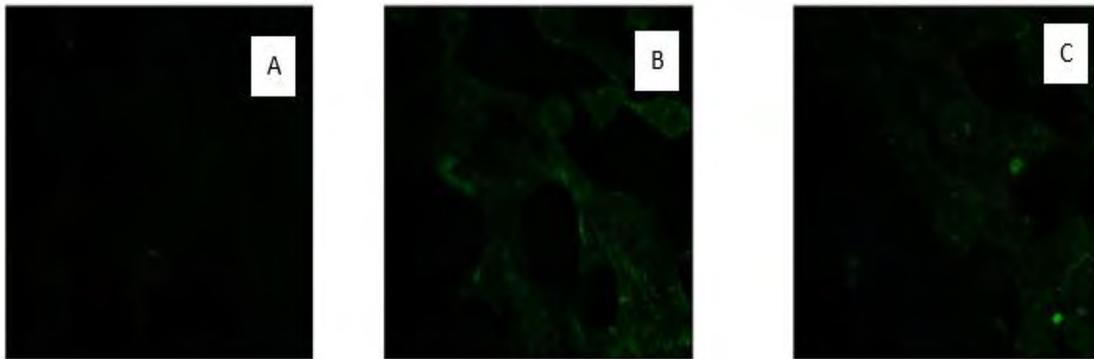


Figura 24. LRBA en fibroblastos humanos por microscopía confocal. A. Fluorescencia control de isotipo. B. LRBA en fibroblastos de testigo. C. LRBA en paciente con CVID y mutaciones en LRBA.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La metodología diseñada para el estudio de una proteína depende de la naturaleza de la misma, cuyos aspectos incluyen estabilidad química, interacción con otras moléculas, su ubicación celular, la cantidad contenida en la muestra, entre otros. Respecto a Lrba, es una proteína intracelular de alto peso molecular que se expresa de manera ubicua en las células del organismo, con aumento en células del sistema inmune como linfocitos B y macrófagos tras ser estimuladas con LPS (Wang et al., 2014) y cuya función es hasta el momento desconocida. En una persona sana adulta, hay de 1.3 a 2.9 linfocitos por mL de sangre periférica que representa pocas células, que son insuficientes para realizar cada ensayo, ya que se requieren aproximadamente 50 millones de éstas. Por ello, es valiosa la utilización de modelos animales en el presente trabajo.

Una vez conocida la naturaleza de la proteína, se debe analizar la información que quiere obtenerse de ella, lo que lleva a la elección de técnicas que se utilizarán. Aquí se utilizaron tres técnicas que requieren de la utilización de anticuerpos. El principal reto fue que al no haber anticuerpos fabricados para reconocer la proteína murina, se utilizaron anticuerpos dirigidos contra la proteína humana, partiendo del hecho de que son idénticas en la composición global de sus aminoácidos en un 90%.

Los anticuerpos utilizados reconocen secuencias con una longitud de 129 a 251 aminoácidos en la proteína en diferentes posiciones (Figura 16) y de acuerdo a un análisis del grado de homología que existe entre LRBA y Lrba de las secuencias reconocidas por dichos anticuerpos (Gráfico 1), resulta ser la zona reconocida por el ab193027 donde hay más homología (96.9%), seguido por la región correspondiente al ab121601 con homología de 71.2%, por lo que son los anticuerpos en los que se centra la investigación.

Aunque el análisis de la composición de aminoácidos en segmentos determinados de una proteína es de gran utilidad para conocer su naturaleza, se debe complementar con la predicción de su estructura tridimensional. En este caso, se utilizó la base de datos Ensembl para observar que en el extremo N-terminal de la proteína (la región reconocida por el anticuerpo ab193027), hay una conformación diferente entre LRBA y Lrba que impide al anticuerpo unirse a la proteína, ya que en este extremo se encuentra una parte del Armadillo-

type fold (plegamiento tipo armadillo) predicho para ambas proteínas pero con diferente extensión (Figura 16).

En la proteína del ratón, Armadillo-type fold se ubica posterior al aminoácido 251, mientras que en LRBA está antes. Se trata de un plegamiento en forma de super hélice compuesto de dos capas de secuencias plegadas en forma de alfa-hélice (Grooves y Bradfort, 1999) lo que le confiere una estructura tridimensional diferente. Además, hay una mayor porción del dominio ConA-like inmerso en esta zona de Lrba que de LRBA, y ya que es un dominio que puede asociarse con oligosacáridos, puede afectar a la unión al anticuerpo.

Por otra parte, la secuencia que reconoce el anticuerpo ab121601, existe una homología del 71.2% y según la Figura 16, no hay evidencia que indique diferencias o similitudes en la estructura tridimensional de la proteína. Otro aspecto a considerar fue la proporción de ciertos aminoácidos en cada fragmento reconocido por los anticuerpos, pues la naturaleza de éstos es uno de los factores que determina la antigenicidad de una molécula y la afinidad que tiene un anticuerpo por su antígeno correspondiente.

Generalmente, los aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina) producen una mayor antigenicidad, mientras que los aminoácidos no polares como la prolina, reducen la capacidad de unión del anticuerpo con el antígeno (García, 1997). Por esta razón, se identificaron dichos aminoácidos en los inmunógenos de cada anticuerpo (inciso b de los resultados), sin embargo, no se observaron diferencias visibles en cuanto al contenido de estos aminoácidos entre la secuencia humana y la murina, por lo que la naturaleza de los aminoácidos no altera el reconocimiento del anticuerpo hacia la proteína.

En la Figura 20 (que será analizada más adelante), se muestra que el anticuerpo con mayor homología no es con el que se obtiene una mejor lectura de la expresión de Lrba en linfocitos estimulados con LPS mediante citometría, sino con ab121601. Aunque no se muestran en el presente documento, los resultados del ab193027 obtenidos de Western blot y microscopía confocal, el resultado fue el mismo, pues no se visualizó ninguna banda en la membrana ni una diferencia de fluorescencia en la segunda técnica.

Sin embargo, en Western blot, la proteína está linealizada, es decir que pierde su conformación tridimensional, lo que podría facilitar el reconocimiento del anticuerpo a la

proteína, dependiendo del anticuerpo utilizado. El peso molecular de la proteína está predicho con base en el contenido de aminoácidos, sin embargo, sólo se ha podido obtener la estructura de la asociación entre sus dominios PH-BEACH (Gebauer et al., 2004), sin saber a ciencia cierta lo que ocurre en otros dominios o secuencias como lo es el extremo N-terminal, por lo que sólo se pueden hacer especulaciones acerca de la ineficiencia de unión de este anticuerpo a Lrba.

La casa comercial de los anticuerpos utilizados (Abcam® y Novus biologicals®) reportan como aplicaciones probadas a tinciones inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia para ab121601, y para los dos restantes (ab193027 y ab 121765), solamente inmunohistoquímica, es decir, que no están probados ni en Western blot ni citometría de flujo (Cuadro 6).

La técnica de inmunohistoquímica tiene como objetivo principal detectar cualitativa y/o cuantitativamente la presencia de una molécula específica en un tejido. Esto significa que el procedimiento llevado a cabo en esta técnica, implica una serie de procedimientos que requieren la utilización de diferentes solventes, lo que podría llevar a alterar en cierta medida la integridad de la proteína (Lin y Prichard, 2015), y por ello tener diferentes resultados que los obtenidos por las técnicas propuestas.

Al realizar ensayos de Western blot, el ab121601 detecta de manera específica y con patrón reproducible una banda única de peso molecular entre 250 y 180 kD (Figura 17), que no corresponde al peso molecular calculado para ninguna de las isoformas de Lrba que son de 315, 309 y 286 kDa. Por otro lado, se ha determinado la posibilidad de la existencia de otras isoformas, por ejemplo, la base de datos de ENSEMBL reporta la existencia de una cuarta isoforma con un peso molecular de 85kDa, lo que sugeriría que la detección de una sola banda en todos los Western-Blots realizados estaría relacionada con una isoforma no reportada a la fecha en el ratón y que sea predominante en el tejido linfoide, esta posibilidad debe ser comprobada en trabajos futuros.

Al realizar la electroforesis en gel de SDS, se cargan negativamente las proteínas de la muestra purificada, con la finalidad de que únicamente se desplacen por el campo electroforético en función de su tamaño y, adicional a esto, provoca la descomposición de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína, quedándose en su estructura

lineal. De esta manera, la linealización de la proteína favoreció el reconocimiento de la secuencia peptídica, al estar completamente disponible, lo que a su vez indica que el anticuerpo reconoce la estructura primaria de dicha secuencia. En el caso del bazo se observa una expresión basal de Lrba, pero que aumenta con la estimulación (Figura 17). En médula ósea la expresión se observa prácticamente nula cuando se cultivan sin estímulo y una expresión discreta al ser estimuladas con LPS e IL-4. En el timo se utilizó un estímulo diferente porque la población de linfocitos predominante es de linfocitos T, por lo que se buscó activar a esta población, lo que indica que Lrba también se expresa en estas células.

Una vez demostrada la utilidad de ab121601 para detectar la expresión de Lrba en diferentes órganos linfoides y bajo el esquema de probar otras aplicaciones, se utilizó citometría de flujo para determinar el comportamiento de expresión de la proteína en diferentes poblaciones de linfocitos B, provenientes de bazo que es un órgano del cual se puede obtener un gran número de células y tiene características peculiares en el desarrollo de linfocitos B.

En citometría de flujo, las células deben estar íntegras, ya que con las tinciones apropiadas pueden medirse una gran variedad de parámetros como lo es Lrba a partir del paso de células o partículas de forma individual a través de láseres, lo que permite hacer una medición de cada una de las células (Lyons y Parish, 2004). Para estandarizar dicha técnica, así como microscopía confocal, en la detección de la proteína intracelular Lrba se plantearon más aspectos a considerar. Como se observa en las Figuras 18 y 19 y en el Gráfico 3, los resultados iniciales no proporcionaron datos que permitieran detectar la expresión de Lrba en diferentes condiciones, por lo que se realizaron modificaciones a ambas técnicas.

El principal factor a considerar fue elegir una solución permeabilizadora de tal forma que no dañara la integridad de la membrana celular, ni de la proteína, pero que proporcionara un tamaño de poro suficiente para el paso del anticuerpo; por esta razón, aunque no se muestran los resultados, además de probar dos tipos de permeabilizador (saponina y tritón), la concentración de éste fue cambiada alrededor de tres veces para llegar a la correcta.

Otro factor importante, fue la concentración de los anticuerpos anti-LRBA y el control de isotipo; este último consiste en una solución de IgG de la misma especie de la cual proviene

el anticuerpo que se desea probar (en este caso ab121601, es un anticuerpo de conejo), que se une de manera inespecífica.

Al construir los histogramas y realizar la diferencia de las señales de Lrba e isotipo, si el resultado es positivo, quiere decir que la fluorescencia que se emite se debe a la expresión de la proteína y no por la unión inespecífica del anticuerpo anti-Lrba; asimismo, si la expresión que esté por debajo de la señal dada por el control de isotipo se considera como negativa, y se debe a que el anticuerpo se une de manera inespecífica. Los resultados en este estudio, todos fueron positivos, para lo cual se tuvieron que hacer modificaciones a la técnica inicial.

El uso de los dos anticuerpos descritos anteriormente, se emplea sobre todo cuando la especificidad del anticuerpo no es tan precisa, como es el caso del anti-LRBA utilizado, cuya naturaleza es policlonal, es decir, que es producto de la inmunización de un vertebrado (en este caso, conejo) con el inmunógeno, lo que da lugar a producción de anticuerpos heterogéneos y con reacción a distintos epítopos (Suckow, Stevens y Wilson, 2012). Por ello, la concentración de estos dos componentes debe ser la misma y así, tener resultados precisos acerca de la expresión de la proteína.

Debido a las modificaciones realizadas a la tinción inicial (Figura 18), se logró encontrar al anticuerpo con mayor eficiencia para demostrar la expresión de Lrba en linfocitos B de ratón (Figura 20): ab121601, el cual muestra una mayor intensidad media de fluorescencia a comparación de los restantes anticuerpos probados y cuyas razones fueron discutidas anteriormente. Además, se utilizó un marcador de activación de linfocitos para demostrar que los linfocitos que expresaron Lrba habían sido activados por las condiciones proporcionadas experimentalmente, es decir por LPS e IL-4 (Figura 21).

Una vez considerados estos factores, se logró reducir la dispersión de los datos obtenidos por citometría de flujo, como se muestra en el Gráfico 3 y de esta forma se pudo demostrar la reproducibilidad de los resultados obtenidos en dicha técnica. Se utilizó la Prueba de Student para mediciones pareadas porque esta prueba es de utilidad para poblaciones pequeñas y, además, los datos se consideran pareados porque provienen del mismo individuo, pero con diferentes condiciones (Rao, 2007): basal, cultivados sin estímulo y cultivados con estímulo.

Dadas estas condiciones, se encontró un aumento significativo discreto en la expresión de Lrba en linfocitos B totales cuando son estimulados con LPS, respecto a los niveles en condiciones basales y cultivados sin ningún estímulo (Gráfico 3). Esto significa que bajo las condiciones utilizadas se puede detectar un aumento de la expresión de Lrba en linfocitos B de ratones. Reportes anteriores (Wang et al., 2001), han mostrado únicamente la expresión del mRNA de Lrba. Aunque el tamaño de la muestra fue el correcto al tratarse de ratones singénicos, es decir que no hay variabilidad genética entre un individuo a otro, la utilización de anticuerpos policlonales puede llevar a una reproducibilidad menor si se compara a la obtenida con anticuerpos monoclonales, lo que afectó el valor de p al realizar el análisis estadístico.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la expresión de Lrba en diferentes etapas de maduración, sólo se encontró un aumento significativo entre los linfocitos B maduros estimulados con LPS, con respecto a los basales y los que no fueron estimulados. Esto puede deberse a dos causas: la primera es porque la edad de los ratones utilizados es de 22 semanas, lo que significa que éstos habían alcanzado la adultez y por lo tanto la mayoría de los linfocitos que existen en el bazo son maduras, pues han entrado en contacto con antígenos a lo largo de su vida (Suckow et al., 2012), y una cantidad menor de linfocitos se encuentran en estados transicionales, por lo tanto, eso aumentó la dispersión de los datos obtenidos que repercute en el análisis estadístico. Además, las células maduras están listas para ser activadas vía BCR, lo que supone niveles de actividad intracelular mayor (Chung, Silverman y Monroe, 2003), proceso en el cual Lrba está involucrado y por lo tanto aumentan sus niveles.

Aunque el análisis estadístico indica que en las células transicionales 2 no hay un aumento significativo de Lrba en las células estimuladas, se puede ver que existe una tendencia de un incremento en la expresión de la proteína en estas células, lo que coincide con el hecho de que en este estadio de desarrollo hay una mayor actividad intracelular, pues ha superado la selección negativa, ha expresado IgD y está a punto de convertirse en célula madura (Chung et al., 2003). Por último, las células transicionales 1 son más propensas a sufrir apoptosis (Chung et al., 2003), es decir, que las células con menos oportunidad de sobrevivir expresan menos Lrba. Lo anterior son solamente sugerencias, por lo que se deben realizar estudios más específicos que ayuden a comprender estos fenómenos. Otro aspecto importante de la

técnica fue la introducción de un marcador (PNA) de activación de células, con lo que se redujo la variación en los resultados de Lrba, pues se seleccionaron solo los linfocitos B activados.

Por último, los resultados de microscopía confocal no fueron satisfactorios a pesar de que en citometría de flujo se demostró la utilidad del anticuerpo para reconocer la proteína de ratón. Desde la tinción inicial, no había diferencia visible en la fluorescencia de las células teñidas con el control de isotipo con las teñidas con ab121601. Por eso se implementó la técnica de panning que permitió enriquecer la cantidad de linfocitos B presentes en las muestras de bazo, con la utilización de un anticuerpo dirigido contra los linfocitos T. De esta manera, cerca del 75% de las células vistas en el microscopio fueron linfocitos B, además el marcaje de citoesqueleto con el anticuerpo anti-falidina rodaminado se pudieron distinguir las células íntegras (Figura 22) descartando así la visualización de células que no son de interés.

Aunque se aumentó hasta 40 veces la concentración del anticuerpo ab121601 con respecto a la utilizada en citometría de flujo aun cuando las condiciones utilizadas con similares, no hay una diferencia visible entre el isotipo y Lrba, ni de las estimuladas contra las no estimuladas (Figura 23). Una posible explicación es que los láseres de un microscopio confocal requieren una señal más fuerte de fluorescencia que los de un citómetro de flujo, respaldado por el hecho de que, en la ficha técnica del anticuerpo, se piden concentraciones más altas para trabajar con técnicas de inmunofluorescencia, aunque también es posible que la afinidad del anticuerpo ab121601 por el epítipo que reconoce, sea pobre. Además, en un citómetro de flujo prácticamente no hay ninguna barrera que impida la lectura de la fluorescencia, mientras que la manipulación de las células, así como el uso de laminillas en microscopía confocal podrían dificultar la lectura.

Adicional a los resultados obtenidos en el modelo de ratón, también se realizaron ensayos de citometría de flujo en muestras de sangre periférica provenientes de tres testigos humanos, con la técnica utilizada para linfocitos B de ratón, pero al emplear ab121765, se emitieron resultados favorables en la detección de LRBA (Gráfico 6). Sin embargo, la dispersión de los datos es muy grande. Además, en microscopía confocal si se encontraron buenos resultados, pero se requirió utilizar fibroblastos tanto control como deficientes de LRBA con ab121601 (Figura 24).

Finalmente, es importante recalcar, que las herramientas metodológicas con las que ahora se cuentan para el estudio de Lrba tanto en humano como en ratón, permitirán avanzar en el estudio de esta proteína en ambas especies.

CONCLUSIONES

- Se validó el uso del anticuerpo anti-LRBA humano ab121601 en células B murinas mediante técnicas de Western blot y, citometría de flujo.
- Aunque el ab193027 tiene mayor homología entre los epítomos que reconoce de ratón y de humano, el ab121601 es más eficiente en muestras provenientes de ratón.
- Las condiciones apropiadas para detectar la expresión de Lrba en linfocitos B de ratón por citometría de flujo y Western blot, son la utilización de ab121601 en muestras cultivadas 48 horas con LPS e IL-4 *concentración*.
- El anticuerpo ab121601 es eficiente para detectar la expresión de Lrba en extractos proteicos provenientes de bazo, médula ósea y timo de ratón.
- El anticuerpo ab121601 es eficiente para detectar la expresión de Lrba en linfocitos B de ratón totales en condiciones basales, cultivadas sin ningún estímulo y cultivadas con LPS e IL-4, en esta última condición existe un aumento significativo de la proteína.
- La expresión de Lrba *in vitro* es diferente en cada estadio de diferenciación de células B en bazo. Hay un aumento significativo de dicha proteína en células maduras cuando son estimuladas con LPS 15µg/mL e IL-4 100 ng/mL por 48 horas.
- No se visualizó la localización celular de Lrba, se sugiere la utilización de otro tipo celular con mayor proporción de citoplasma para facilitar el reconocimiento de la localización celular de la proteína.
- El anticuerpo ab193027 no es eficiente para la detección de Lrba en linfocitos B de ratón por ninguna de las técnicas realizadas.

PERSPECTIVAS

Debido a los resultados observados en las técnicas de Western blot y citometría de flujo, se podrá utilizar la metodología aquí propuesta para realizar más ensayos que permitan ahondar en el conocimiento de Lrba. Los resultados provenientes de muestras humanas, indican que la metodología diseñada también es aplicable en éstas, por lo que ab121765 también es válido en citometría de flujo; a diferencia del modelo murino, la tinción de fibroblastos humanos con ab121601 si es eficiente. Esto significa que podrá utilizarse también esta metodología para ensayos en humanos, muy valioso en la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría.

REFERENCIAS

1. Actor, J. (2014), *Introductory Immunology. Basic Concepts for Interdisciplinary Applications*, London, UK: Academic Press, ELSEVIER.
2. Barrera, L., Drago, M., Zamora, A., Sáinz, T. y Mendoza, F. (2004). Citometría de flujo: un vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(1): 42-55.
3. Bellanti, J., Escobar-Gutiérrez, A. y Tsokos, G. (2012), *Immunology IV. Clinical Applications in Health and Disease*, Washington, USA: I Care Press.
4. Bemark, M. (2015). Translating transitions - how to decipher peripheral human B cell development. *The Journal of Biomedical Research*, 29(4): 264-284.
5. Bemark, M., Holmquist, J., Abrahamsson, J. y Mellgren, K. (2011). Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. Reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation– revelation of B cell developmental pathways and lineage phenotypes. *Clinical and Experimental Immunology*, 167: 15-25.

6. Burguer, J. y Chiorazzi, N. (2013). B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends in Immunology*, 34(12): 592-601.
7. Burgess, A., Mornon, J. y Saint-Basile, G. (2009). A concavalin A-like lectin domain in the CHS1/LYST protein, shared by members of the BEACH family. *Bioinformatics*, 25(10): 1219-1222.
8. Cullinane, A., Schäffer, A. y Huizing, M. (2013). The BEACH Is Hot: a LYST of Emerging Roles for BEACH-Domain Containing Proteins in Human Disease. *Traffic*, 14: 749-766.
9. Deane, S., Selmi, C., Naguwea, S., Teuber, S. y Gerswin, M. (2009), Common Variable Immunodeficiency: Etiological and Treatment Issues, *Int Arch Allergy Immunol*, 150(4), 311-324.
10. De la Fuente, A., Rodríguez, J. y Fonseca, E. (2007). Análisis de proteínas mediante electrophoresis e inmunotransferencia (Western blot), *Piel*, 22(5); 252-258.
11. Fuhrman, B., Zimmerman, J., Carcillo, J., Clark, R., Relvas, M., Rotta, A., Thompson, A. y Tobias, J. (2011), *Pediatric Critical Care (Fourth Edition)*, Philadelphia, USA: Elsevier Saunders.
12. Gámez-Díaz, L., August, D., Stepensky, P., Revel-Vilk, S., Seidel, M., Noriko, M., ... Grimbacher, B. (2015). The extended phenotype of LPS-responsive beige-like anchor protein (LRBA) deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137, 223-230.
13. García, F. (1997). *Fundamentos de inmunobiología*. Distrito Federal, México: UNAM.
14. Gebauer, D., Li, J. Jogl, G., Shen, Y., Myszka, D. y Tong, L. (2004), Crystal structure of the PH-BEACH domains of human LRBA/BGL. *Biochemistry*, 43(47), 14873-14880.
15. Groves, M. y Bradford, D. (1999) Topological characteristics of helical repeat proteins. *Current opinion in Structural Biology*, 9(3), 383-389.
16. Gulati, G. Ashton, J. y Hyun, B. (1988). Structure and function of bone marrow and hematopoiesis. *Journal of Hematology and Oncology Clinical of North America* 3(4): 495-511.

17. Henrikson, R. y Mazurkiewicz, J. (1997), *Histology*, New York, USA:Lippincott Williams & Wilkins.
18. Hardy, R. y Hayakawa, K. (2001). B Cell Development Pathways. *Annual Review Immunology*, 19: 595-621.
19. Kerr, W., Heller, M. y Herzenberg, L. (1996). Analysis of lipopolysaccharide-response genes in B-lineage cells demonstrates that key can have differentiation stage-restricted expression and contain SH2 domains.
20. Kersey, J. y Gajl-Peczalsca, K. (1975). T and B lymphocytes. *American Journal of Pathology*. 81(2), 445-457.
21. LeBien, T. y Tedder, T. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 112(5), 1570-1580.
22. Lin, F. y Pritchard, J. (2015). *Handbook of practical immunohistochemistry*. New York, USA: Springer
23. Loder, F., Mutschler, B., Ray, R., Paige, C., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M. y Carrsetti, R. (1999). B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *Journal of Experimental Medicine*, 190(1), 75-89.
24. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. (2000) *Molecular cell biology*, 4th edition. New York, USA: W.H. Freeman.
25. López-Herrera, G., Tampella, G., Pan-Hammarström, Q., Herholz, P., Trujillo-Vargas, C., Phadwal, K.,... Grimbacher, B. (2012). Deleterious Mutations in *LRBA* Are Associated with a Syndrome of Immune Deficiency and Autoimmunity. *The American Journal of Human Genetics*, 90, 1-16.
26. Lyons, B. y Parish, C. (1994). Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 171(2), 131-137.
27. Lund, F. (2008). Citokine-producing B lymphocytes- key regulators of immunity. *Current Opinion of Immunology*, 20(3), 332-338.
28. Mathews, C., van Holde, K. y Ahern, K. (2002), *Bioquímica*, Madrid, España: Pearson Educación.
29. Mebius, R. y Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology*, 5: 606-617.

30. Merino, M. Y Gruppi, A. (2006). Origen y desarrollo de linfocitos B1 una población celular involucrada en defensa y autoinmunidad. *Medicina*, 66(2), 165-172.
31. Meyer, D. (1985), *Laboratory Guide for Human Histology*, Detroit, USA; Wayne State University Press.
32. Miján, A., (2002). *Técnicas y métodos de investigación en nutrición humana*, Barcelona, España; Glosa
33. Monroe, J. y Rothenberg, E. (1998), *Molecular biology of B-cell and T-cell development*, New York, USA: Springer Science+Business Media, LCC.
34. Moticka, E. (2016), *A Historical Perspective on Evidence-Based Immunology*, Amsterdam, Netherlands: ELSEVIER
35. Murphy, K., Travers, P. y Walport, M.(2009), *Inmunobiología de Janeway. Séptima edición*. México DF, México :McGraw-Hill.
36. Phadwal, K., Watson, A. y Simon, A. (2012). Tightrope act: autophagy in stem cell renewal, differentiation, proliferation, and aging. *Cellular and Molecular Life Sciences*, DOI 10.1007/s00018-012-1032-3
37. Pihlgren, M., Silva, A., Madani, R., Giriens, V., Waeckerle-Men, Y., Fettelschoss, A., Johansen, P. (2013). TLR4- and TRIF-dependent stimulation of B lymphocytes by peptide liposomes enables T cell-independent isotype switch in mice. *Blood*, 121 (1), 85-94.
38. Pone, E., Xu, Z., White, C., Zan, H. y Casali, P. (2012). B cell TLRs and immunoglobulin class-switch DNA recombination. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 17 (2012), 2594-2615
39. Ramos-Bello, D. y Llorente, L. (2009). Fiftieth anniversary of the description of the chemical structure of antibodies. *Reumatología Clínica Elsevier*, 5 (6), 280-284.
40. Rao, K. (2007), *Biostatistics. A manual of statistical methods for use in health, nutrition and anthropology*, New Delhi, India: Jaypee brothers medical publishers.
41. Riedel, S. (2005). Edward Jenner and the history of smallpox vaccination. *BUMC Proceedings*, 2005(18), 21-25.
42. Rodak, B. (2005), *Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas*, Buenos Aires, Argentina; Editorial Médica Panamericana.
43. Rodríguez-Alba, C., Moreno-García, M., Sandoval-Montes, C., Rosales-García, V. y Santos-Argumedo, L. (2008). CD38 induces differentiation of immature transitional 2 B lymphocytes in the spleen. *Blood*, 111(7): 3644-52.

44. Sampedro, A., de los Toyos, J. y Martínez, A. (1995), *Técnicas de fluorescencia en microscopía y citometría*. Oviedo, España: Universidad de Oviedo.
45. Serrano, J. (2007). Nefropatía lúpica membranosa. *Medicina Clínica*, 129(6), 228-235.
46. Suckow, M., Stevens, K. y Wilson, R. (2012), *The laboratory rabbit, Guinea pig, hamster and other rodents*. London, UK: Academic Press.
47. Toche, P. (2012). Panoramic vision of the immune system. *Rev.Med.Clin.Condes*, 23(4), 446-457.
48. Treanor, B. (2012). B-cell receptor: from resting state to activate. *Immunology*, 136, 21-27
49. Vale, A., Kearney, J., Nobrega, A. y Schroeder (2015). Chapter 7- Development and Function of B Cell Subsets. En Alt, F., Honjo, T., Radbruch, A. y Reth, M. (Ed.), *Molecular Biology of B Cells* (pp. 99-119). London, UK; Academic Press, Elsevier
50. Wang, J., Howson, J., Haller, E. y Kerr, W. (2001). Identification of a Novel Lipopolysaccharide-Inducible Gene with Key Features of Both a Kinase Anchor Proteins and chs1/beige Proteins. *Journal of Immunology*, 166: 4586-4595.
51. Wang, J. y Lockey, R. (2014). Lipopolysaccharide-responsive beige-like anchor (LRBA), a novel regulator of human immune disorders. *Austin Journal of Clinical Immunology*, 1(1): 1-9.

ANEXO 1: Fundamentos de las técnicas utilizadas

A) CITOMETRÍA DE FLUJO

Se trata de un método de separación y examinación de partículas (que pueden ser células, organelos u otras partículas en suspensión) que permite la medida simultánea de diversos parámetros (Bellanti, et al., 2012).

El principio que hace posible esta tecnología consiste en hacer pasar partículas en suspensión alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso, cuya información puede ser producida por la dispersión de la luz o por la emisión de luz proveniente de fluorocromos tras ser excitados por un rayo luminoso (Barrera, Drago, Zamora, Gómez, Sáinz y Mendoza, 2004). El flujo de partículas intersecta en su camino un rayo de luz muy focalizado, lo que proporciona señales ópticas que son recogidas por detectores. Una vez ahí son convertidas en eventos electrónicos que son a su vez digitalizados y computarizados en cuestión de milisegundos (Sampedro, de los Toyos y Martínez, 1995).

La utilización de láseres proporciona la energía de excitación permitiendo la medida de tipos celulares, que pueden involucrar tinciones fluorescentes conjugadas con anticuerpos que reconocen diversas superficies de la partícula de estudio, lo que se conoce como inmunofluorescencia. Además, cada célula produce una dispersión frontal y una dispersión lateral no fluorescente lo que permite conocer su tamaño y complejidad, respectivamente (Bellanti, et al., 2012).

En la Figura 25, se esquematiza el principio general de la citometría de flujo, en el que se toman en cuenta el sistema hidráulico, el sistema óptico y el sistema electro informático.

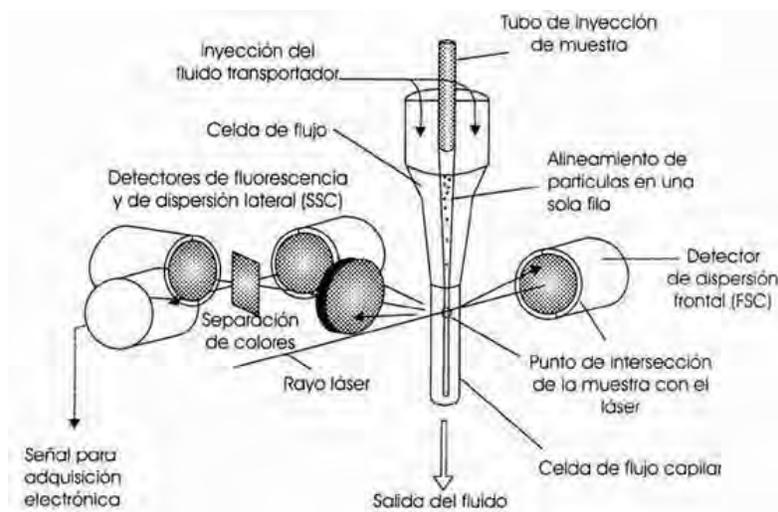


Figura 25. Principio general de la citometría de flujo (Barrera et al., 2004)

Algunas de las ventajas de la citometría de flujo son:

- Visualizar en tiempo real de los parámetros de interés
- Adquirir, almacenar y/o analizar eventos únicamente de las poblaciones de interés
- Separar físicamente las poblaciones de interés
- Obtener medidas cuantitativas y análisis multiparamétricos muy precisos

(Sampedro et al., 1995)

B) WESTERN BLOT

El Western blot es una técnica que combina un proceso electroforético y acontecimientos inmunoquímicos, que se emplea para detectar en una mezcla de proteínas o fragmentos de proteínas, las que reaccionan con el mismo anticuerpo (Mathews et al., 2010).

Cuando se aplica un campo eléctrico a una solución, las moléculas de soluto con carga neta positiva se desplazan hacia el cátodo y las moléculas con carga neta negativa se desplazan hacia el ánodo. Este proceso se denomina electroforesis, que permite separar moléculas en función de su carga y su tamaño, lo cual, en el caso de Western blot, requiere de proteínas cargadas negativamente para que puedan desplazarse a través de un gel de poliacrilamida. Para lograr que una proteína o fragmento peptídico adquiriera ésta carga y se encuentre en su estructura primaria, se utiliza el detergente iónico SDS que desnaturizará a la molécula y le proporcionará carga negativa (Miján, 2002).

Tras la electroforesis, el gel se pone en contacto con una membrana de nitrocelulosa o PVDF, que son soportes más estables. Las proteínas se transfieren mediante una corriente eléctrica y quedan unidas de manera irreversible, con lo que las reacciones antígeno- anticuerpo pueden observarse después de tratar la membrana con un anticuerpo (Mathws, et al., 2010).

Antes de poner en contacto a la membrana con el anticuerpo, se bloquean los sitios de unión inespecíficos, con lo que se mejora la unión específica antígeno-anticuerpo. Posteriormente se adiciona el anticuerpo primario que reconocerá al antígeno específico de la proteína de interés, tras lo cual se retira el exceso para añadir segundo anticuerpo. Este segundo anticuerpo está unido a algún tipo de marcador que permita revelar su presencia (Miján, 2002).

En la Figura 26 se esquematiza el principio general de la técnica de Western blot.

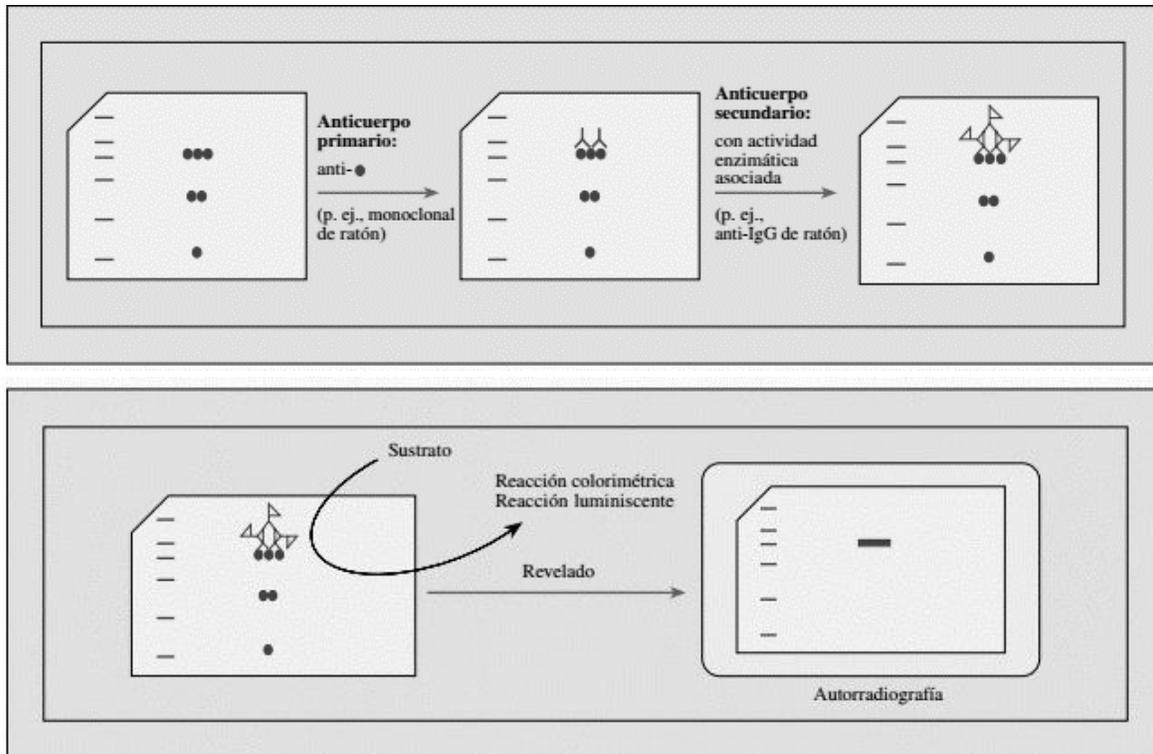


Figura 26. Principio general de Western blot (de la Fuente, Rodríguez y Fonseca, 2007)

Sus aplicaciones son muy numerosas, entre las que destacan:

- Diagnóstico de enfermedades infecciosas, hereditarias y congénitas, cáncer
- Investigación en inflamación y envejecimiento celular
- Como herramienta de la genómica

(de la Fuente, et al., 2007)

C) MICROSCOPIA CONFOCAL

La microscopía confocal de barrido láser es una técnica de observación microscópica cuyo éxito se debe a las ventajas que ofrece frente a la microscopía óptica tradicional (mayor nitidez y resolución) y, sobre todo, a la posibilidad de obtener imágenes de varias secciones ópticas de la muestra, lo que permite su estudio tridimensional (Sampedro et al., 1995).

Por otro lado, en la microscopía de fluorescencia convencional, la luz fluorescente emitida por una muestra proviene de moléculas por encima y por debajo del plano de foco, causando una imagen borrosa debido a la superposición de imágenes fluorescentes de moléculas ubicadas a muchas profundidades de la célula. Como resultado, se dificulta la determinación de la disposición molecular tridimensional real (Lodish et al., 2000).

En la microscopía confocal, un rayo de luz, con preferencia un láser, es reflejada por un espejo dicróico que se enfoca sobre un volumen muy pequeño a nivel que se desee dentro de

la muestra. La luz fluorescente o reflejada por este punto se envía de vuelta a un detector a través de un poro que excluye la luz dispersada por otras regiones a través del espejo dicróico y es enfocada en un fotomultiplicador (Mathews et al., 2002). Una vez enfocada, se coloca un diafragma o pihhole delante del fotomultiplicador para eliminar las señales procedentes de la zona fuera de foco. Se realiza un barrido hacia atrás y hacia delante de la posición del lugar en la muestra al mismo nivel, lo que permite construir electrónicamente un corte muy fino a elevada resolución, que, al repetirse a diferentes niveles, se construye una imagen tridimensional (Sampedro et al., 1995). El principio general de la microscopía confocal se esquematiza en la Figura 27.

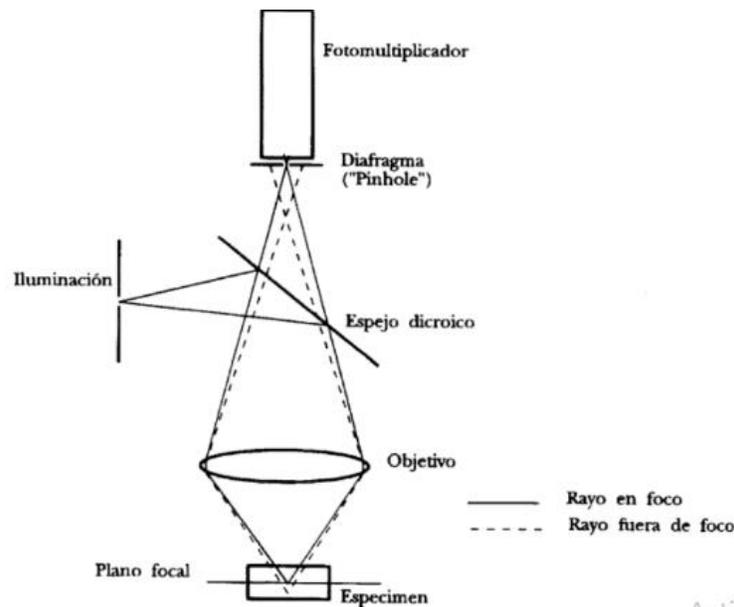


Figura 27. Principio general de la microscopía confocal.

Debido a que el método es relativamente poco destructivo, puede emplearse para el seguimiento de procesos dinámicos de las células y el estudio de la estructura celular. El continuo desarrollo de marcadores fluorescentes y de sistemas de microscopía confocal permite trabajar con un mayor número de marcajes de manera simultánea (Mathews et al., 2002 y Sampedro et al., 1995).

ANEXO 2: Características de los anticuerpos anti-LRBA utilizados

A continuación se presenta un cuadro con las especificaciones de los anticuerpos probados para detectar la expresión de Lrba en los linfocitos de ratón. La información es proveniente de la página de internet del proveedor de los anticuerpos (<http://www.abcam.com/>).

Cuadro 6. Características de los anticuerpos Anti-LRBA humano utilizados

Anticuerpo	Clonalidad	Isotipo	Control positivo	Aplicaciones probadas por la casa comercial	Inmunógeno
<i>Ab121601</i>	Policlonal	IgG	Tejido de estómago humano	Inmunoquímica Inmunofluorescencia Inmunohistoquímica	1541-1672
<i>Ab121765</i>	Policlonal	IgG	Tejido rectal humano	Inmunohistoquímica	907-1038
<i>Ab193027</i>	Policlonal	IgG	Tejido placentario humano	Inmunohistoquímica	1-251

ANEXO 2: Procedimiento experimental realizado en muestras provenientes de humanos

A) Obtención de muestras

Se utilizaron dos tipos celulares: linfocitos de sangre periférica y fibroblastos de piel.

LINFOCITOS

- 1.- Para obtener sangre periférica, se realizó venopunción a personas sanas voluntarias y se extrajeron de 3 a 5 mL de sangre que fueron colocados en tubos estériles con Citrato de sodio.
- 2.- Se deslizó suavemente la sangre por las paredes de un tubo Falcon de 15 mL que contenía Histopaque®-1077 de Sigma Aldrich en condiciones de esterilidad.
- 3.- A continuación, se centrifugó a 524 g por 30 minutos con una desaceleración. Se colectó en otro tubo la capa intermedia formada que contiene las células mononucleares.
- 4.- Se agregó 1 mL de PBS y se centrifugó nuevamente a 524g por cinco minutos. Se retiró el PBS y el botón celular se resuspendió para repetir este paso.
- 5.- Nuevamente, el botón celular se resuspendió, pero en medio de cultivo. Se realizó el conteo de células viables en cámara de Neubauer con tinción negativa utilizando Azul de tripano.

FIBROBLASTOS

Las muestras fueron obtenidas a partir de biopsias de piel provenientes de una persona testigo sana y la segunda de un paciente del Instituto Nacional de Pediatría diagnosticado con Inmunodeficiencia Común Variable y cuyo análisis molecular demuestra déficit de expresión de la proteína LRBA.

Una vez conseguidas, las muestras fueron inmortalizadas para obtener una línea celular la cual fue mantenida en medio DMEM y congelada en medio de congelación a -80°C hasta el momento de su uso.

Cabe aclarar que dicho procedimiento no fue realizado por la sustentante de la presente tesis, que solamente utilizó las muestras ya congeladas.

B) Cultivo celular

LINFOCITOS

1.- Una vez obtenidas las células mononucleares, se colocaron en placas de 24 pozos con medio de cultivo RPMI suplementado a una concentración de 3 millones de células por cada mililitro de medio.

2.- Los estímulos utilizados fueron tres:

- En un pozo se agregó fitohemaglutinina
- En otro pozo se agregó anticuerpo anti-CD3/CD28
- El siguiente fue anticuerpo anti- IgM
- En el último pozo se cultivaron las células únicamente con RPMI suplementado.

3.- Las células se incubaron a 37°C por 24 horas en estufa con CO_2 al 5%.

FIBROBLASTOS

1.- Las células se descongelaron rápidamente y se centrifugaron a $524g$ por 5 minutos. El medio de congelamiento se retiró y el botón celular se resuspendió en 5mL de medio de cultivo DMEM suplementado.

2.- Se colocaron en botellas de cultivo y se cultivaron por 48 horas a 37°C en estufa con CO_2 al 5% .

3.- Una vez que se observó una confluencia celular del 80%, se retiró el medio de cultivo y se agregó 1mL de PBS para lavar con agitación suave.

4.- A continuación, se agregaron 4-5mL de solución de tripsina y se incubó a 37°C por 4 minutos. Después se agregaron 5mL de PBS y se resuspendieron las células. Se transportaron a un tubo Falcon y se centrifugaron a 524g por 5 minutos.

5.- Se resuspendieron en 2mL de medio DMEM y se contaron las células viables en cámara de Neubauer.

c) Citometría de flujo

Se utilizaron las células mononucleares antes mencionadas y las diferencias entre esta tinción y la realizada en linfocitos de ratón fueron las siguientes:

- Los marcadores membranales utilizados fueron CD3 y CD19.
- La cantidad de anticuerpo utilizada de anti-LRBA e isotipo fue de 0.03µg, es decir, se utilizó una cantidad menor.

d) Microscopía confocal

Se utilizaron los fibroblastos antes mencionados y las diferencias entre esta tinción y la realizada en linfocitos de ratón fueron las siguientes:

- Una vez obtenidas las células en suspensión, se colocaron 500µL en cubreobjetos estériles y se incubaron a 37°C por 18 horas en estufa con CO₂ al 5%
- Una vez transcurrido el tiempo, se aseguró que las células estuvieran adheridas al cubreobjetos, en donde se continuó la tinción.
- La cantidad de anticuerpo utilizada de anti-LRBA e isotipo fue de 0.03µg, es decir, se utilizó una cantidad menor.