



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Caracterización de la expresión de la proteína TLR4 en el timo de la rata desde la etapa neonatal hasta la senescencia

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA
TALÍA ESTRADA ROJAS**

ASESORA: Dra. Claudine Liliane Irles Machuca

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Resumen	6
2. Introducción	8
3. Antecedentes	11
3.1 Receptores Tipo Toll	13
3.1.2 Estructura y Función	14
3.1.3 Cascada de señalización del TLR	14
3.1.4 Receptor tipo Toll 4 (TLR4)	15
	16
3.2 Linfocitos T	19
	21
3.3. El timo y el desarrollo de linfocitos T	23
3.3.1 Estructura	24
3.3.2 Función en el desarrollo de linfocitos T	25
3.3.3 Involución tímica	26
3.4 Inmunosenescencia	26
4. Justificación	28
5. Hipótesis	30
6. Objetivos	30
6.1 Objetivo General	30
6.2 Objetivos particulares	30
7. Material y métodos	31
7.1 Diseño experimental	31
7.2 Protocolo de lisis de tejidos	31
7.3 Cuantificación de proteínas	33
7.4 Preparación de muestras de proteínas totales para SDS-PAGE	35
7.5 Separación de proteínas mediante gel de electroforesis desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE)	35
7.6 Transferencia de proteínas	37
7.7 Tinción de membranas con rojo Ponceau	38
7.8 Bloqueo de membranas	39
7.9 Inmunoblot	39
7.10 Revelado	40
7.11 Análisis densitométrico de las proteínas	41
7.12 Análisis estadístico	41

8. Resultados	42
8.1 Estandarización	42
8.2 Análisis de resultados	43
9. Discusión	46
10. Referencias	49
Anexo 1. Preparación de soluciones	52
Anexo 2. Preparación de soluciones para muestras	52
Anexo 3. Preparación de soluciones para electroforesis y transferencia	52
Anexo 4. Preparación de soluciones, anticuerpo primario	52

Reconocimiento

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de la Dra. Claudine Liliane Irles Machuca, del Departamento de Fisiología y Desarrollo Celular del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, en el marco del proyecto de investigación con número de registro 2018-1-141.

Agradecimientos

Agradezco a toda mi familia por su apoyo incondicional y por siempre confiar en mí; definitivamente sin todos ustedes no podría lograr ninguna meta, los logros que llegue a cumplir a lo largo de mi vida se los debo a ustedes.

Muchas gracias a todo el equipo Ratatouille (Jessica, Ruth, Anahid, Vale, Agus y César) por tantos buenos momentos y hacer una gran amistad con ustedes.

Dra Claudine muchas gracias por abrirme las puertas de este gran proyecto y hacerme ver por esta gran ventana de investigación.

Nunca tendré suficientes palabras para expresarle todo mi amor a Wuarache y Hanckey y por supuesto agradecerles porque gracias a ustedes decidí estudiar esta gran carrera y siempre que llego y miro sus lindas caras, así como huelo sus aromas indescriptibles hacen que todo esfuerzo valga la pena.

A todos los animales de laboratorio muchas gracias porque se les debe a ustedes que se logran avances en la ciencia, investigación y enseñanza; por mi parte les prometo que si en algún momento percibo que alguien no les está dando un trato digno, lucharé porque así sea.

Abreviaturas

CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CPA	Célula presentadora de antígeno
DAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Daño (Damage-Associated Molecular Patterns)
DC	Célula dendrítica
IFN	Interferón
IκB	Inhibidor de NF-κB (inhibitor of NF-κB)
IKK	Inhibidor del complejo NF-κB/IκB (Inhibitor of nuclear factor κB (IκB)-kinase complex)
IL	Interleucina
IRAK	Cinasa asociada al receptor de IL1 (IL-1-receptor associated kinase)
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolisacárido
LRRs	Regiones ricas en leucina (leucine-rich repeats)
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos (mitogen-activated protein kinase)
MLP	Progenitor multi-linfoide (multi-lymphoid progenitor)
MyD88	Proteína de respuesta primaria a la diferenciación mieloide 88 (myeloid differentiation primary-response protein 88)
NF-κB	Factor nuclear kappa-β
NK	Células Asesina natural
NKT	Linfocito T asesino natural

- PAMPS** Patrones moleculares asociados a patógenos
(pathogen associated molecular patterns)
- STAT** Transductor de señal y activador de la transcripción
- TCR** Receptor de antígeno del linfocito T
- Th** Linfocito T colaborador
- TLR** Receptor Tipo Toll
- TNF** Factor de necrosis tumoral
- TRAF** Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral

1. RESUMEN

El timo es un órgano linfoide primario responsable de la producción de células T inmunocompetentes, mayormente funcional en animales jóvenes ya que en etapa adulta, el timo comienza a contraerse en su porción cervical, incluso llegando a desaparecer (Dyce, 2007). Si, el timo perdura es posible encontrarlo como un vestigio que consta primordialmente de grasa y elementos fibrosos, con disminución y/o supresión del tejido, a este proceso se le conoce como involución del timo que es dependiente de la edad y es un proceso conservado en todos los vertebrados (Shanley, 2009).

La involución del timo provoca una disminución en el número de linfocitos vírgenes alterando la composición de los linfocitos periféricos, así como su función y fenotipo (Palmer, 2013). Este proceso se lleva a cabo desde la etapa adulta hasta la senescencia, la disminución en la producción de linfocitos T inmunocompetentes conlleva a un proceso llamado inmunosenescencia que se refiere al cambio del sistema inmune con la edad; es decir el envejecimiento del sistema inmunológico. Dentro de los factores descritos que participan en este papel se encuentran diversas citocinas, como IL-1 e IL-6, así como la respuesta de los linfocitos T, predominantemente de tipo Th2.

Cuando el timo comienza a involucionar hay un estado de inflamación, una molécula clave relacionada con este proceso es el TLR4; los receptores tipo Toll desempeñan un importante papel en la respuesta inmune innata contra las infecciones fúngicas y bacterianas ya que inician la transducción de señales intracelulares, que resulta en la expresión de genes involucrados en la

inflamación y la maduración de las células dendríticas, posterior a esto se estimula la activación de factores nucleares que inducen la expresión de citocinas proinflamatorias. (Kawasaki, 2014) Dentro de la etapa fetal y neonatal se desarrolla el timo, la involución de dicho órgano comienza en la etapa puberal. La inmunosenescencia comienza en la etapa adulta y continúa en la etapa senescente.

Por lo tanto el interés de este estudio dentro de la evaluación de la inmunidad adaptativa desde la etapa neonatal hasta la senescencia, es identificar la presencia de TLR4 en las etapas neonatal; puberal; adulta y senescente en el timo de la rata, y con esto valorar si se puede considerar la inmunosenescencia como una inflamación crónica fisiológica. (Dixit, 2012).

Para cubrir el objetivo se obtuvieron timocitos de las etapas descritas, con el método de Bradford se cuantificaron las proteínas y se resolvieron con electroforesis con SDS-PAGE e inmunoblot contra TLR4. Los resultados obtenidos en dicho procedimiento experimental se comprobó la presencia de TLR4 en el timo de la rata, cabe mencionar anteriormente no se había descrito. (Vaure, 2014). En la etapa neonatal y la senescente se mostraron niveles de expresión de TLR4 aumentados con respecto a la etapa puberal y adulta. Siendo que en la adultez la expresión de la molécula es casi indetectable; en la etapa puberal se observó una isoforma con peso molecular cercana a 75 kDa, además de la banda esperada para TLR4 que es de 95 kDa.

La expresión de TLR4 en el timo de la rata macho cambia con la edad siendo las etapas neonatal y senescente las de mayor expresión, con disminución en la etapa adulta. Estos cambios podrían explicar diferencias en el proceso de

inflamación que se pudieran dar de manera fisiológica con la edad.

Se requiere seguir caracterizando la vía de señalización de TLR4-NFκB así como la presencia de la nueva isoforma en la etapa puberal.

2. INTRODUCCIÓN

La defensa de los organismos contra los microbios está mediada por las reacciones tempranas de la inmunidad innata y la respuesta tardía de la inmunidad adaptativa. Este tipo de respuestas inmunitarias son los ingredientes de un sistema integral encargado de defender al anfitrión, en el que funcionan conjuntamente numerosas células y moléculas. Los mecanismos de la inmunidad innata constituyen una primera defensa eficaz contra las infecciones. Aunque el organismo cuenta con el sistema inmune, muchos microorganismos patógenos han evolucionado hasta ser resistentes a la inmunidad innata, y por lo tanto su eliminación exige aquellos mecanismos más potentes generados por la inmunidad adquirida. La respuesta inmunitaria innata frente a los microbios estimula las respuestas inmunitarias adquiridas e influye en la naturaleza de las respuestas adquiridas. Por el contrario, las respuestas inmunitarias adquiridas actúan a menudo potenciando los mecanismos protectores de la inmunidad innata, lo que las hace capaces de combatir eficazmente a los microbios patógenos.

Las células inmunocompetentes que participan en la respuesta inmunitaria tienen su origen en la médula ósea, y se encuentran mayormente en los órganos linfoides como el timo, bazo, nódulos linfoides, placas de Peyer, también las células tienen la posibilidad de dispersarse en el organismo a través del torrente

sanguíneo y la circulación linfática llegando al lugar donde son necesarias (Pearse, 2006).

El timo es el órgano linfoide primario obtiene dicha denominación ya que es el sitio donde se lleva a cabo la linfopoyesis; se encuentra situado arriba del corazón. El estroma tímico es originado a partir de tejido del endodermo y ectodermo, ambas estructuras invaginan, se cierran quedando superpuestas dichas capas es decir la capa ectodérmica rodea a la capa endodérmica; la capa ectodérmica es la encargada de formar el tejido epitelio cortical del timo y la capa endodérmica es quien formará los tejidos epiteliales medulares.

En la corteza se encuentran timocitos en fases tempranas de maduración, así como algunos macrófagos y en la médula se encuentran timocitos en fases más avanzadas de maduración junto con células dendríticas y macrófagos. Por esto es que el timo es el sitio donde se lleva a cabo el desarrollo y maduración de los linfocitos T, es responsable de la producción de distintas células T inmunocompetentes.

Este órgano disminuye su tamaño conforme se incrementa la edad, y esto conlleva a la reducción de la producción de nuevas células T vírgenes e incrementa el repertorio de células T de memoria (Rezzani, 2014).

En el timo se lleva a cabo la maduración de los timocitos, una vez que el linfocito T maduró emigra a la periferia.

Los linfocitos se clasifican en linfocitos T, linfocitos B y células natural killer (NK), estas últimas incluidas dentro de la inmunidad inespecífica en general, aunque cada vez se tiene más evidencia de su participación en los mecanismos

adquiridos. Los linfocitos T se dividen a su vez en “colaboradores” (o helper; se distinguen por la presencia de la molécula CD4 en su superficie) y “citotóxicos/supresores” (caracterizados por la molécula CD8 en su superficie); ambos participan en la inmunidad mediada por células o inmunidad celular. (Rozenek, 2016)

El envejecimiento es un proceso lento y continuo que compromete las características morfológicas y funcionales de distintos órganos y sistemas, se encuentra asociado al deterioro de la función normal del sistema inmune: a éste proceso se le ha denominado “Inmunosenescencia”. Asociado a este proceso fisiológico Claudio Franceschi ha acuñado el término “Inflammaging” que es un término propuesto que describe el estado inflamatorio característico del envejecimiento y que se encuentra asociado con la exposición crónica a antígenos endógenos y/o exógenos (Franceschi, 2000). En este contexto, el envejecimiento del timo puede entonces considerarse como un proceso fisiológico asociado a un aumento en la inflamación de este órgano.

Tanto la inmunidad innata como adquirida se afectan con el envejecimiento lo que genera un impacto negativo en la respuesta inmune de los ancianos y de modelos animales senescentes, y los predispone a padecer enfermedades infecciosas (Domínguez, 2009).

Por lo tanto si el timo es la mayor fuente de linfocitos T del organismo, así como el sitio de maduración y diferenciación de las células T, por lo que es nombrado “el reloj inmunológico del envejecimiento” (García, 2006). La involución del timo

que provoca la disminución de la salida de linfocitos T es un cambio crítico que ocurre en el sistema inmunitario con el envejecimiento. En esta etapa llamada inmunosenescencia, se ha observado una acumulación de sustancias lipotóxicas como fibronectinas, pequeños fragmentos de hialuronano e incluso ácidos grasos saturados en respuesta al daño celular que lleva a un aumento de procesos inflamatorios en el timo que llevan a la atrofia de este órgano. Estas moléculas lipídicas que forman parte de los DAMPs son ligandos de los receptores TLR, y en particular el TLR4, sin embargo se desconoce si este receptor está implicado en la involución del timo.

Con base en los antecedentes descritos, el objetivo del estudio fue caracterizar la expresión del receptor TLR4 en el timo de la rata Wistar a lo largo de todas las etapas de la vida. Para cumplir con el objetivo se utilizaron muestras de tejido de timo de rata de la estirpe Wistar que por sus características como la distribución, tipos celulares, la estructura y la involución de éste órgano, pueden ser comparables entre rata, ratón y humano (Rezzani, 2014).

Para ello, se analizó en timo en cuatro etapas del desarrollo de la rata, neonatal, pubertad, adulto y la senescencia mediante la técnica de Western Blot.

3. ANTECEDENTES

Históricamente, el término inmunidad ha hecho referencia a la protección frente a la enfermedad, específicamente frente a las enfermedades infecciosas (Abbas, 2015). Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmunitario, la función fisiológica del sistema inmunitario es la defensa

contra los microbios infecciosos. Sin embargo, existen sustancias extrañas no infecciosas que pueden desencadenar respuestas inmunitarias (Abbas, 2012).

Concretamente una respuesta inmunitaria es la reacción a los componentes de los microbios, así como a macromoléculas, como proteínas y polisacáridos y pequeñas sustancias químicas, que son reconocidos como extraños, independientemente de la consecuencia fisiológica o patológica de tal reacción. En ciertas situaciones, incluso moléculas propias pueden desencadenar respuestas inmunitarias lo que se llama respuestas autoinmunitarias (Tizard, 2009).

Tabla 1. Comparación de la inmunidad innata y adaptativa (Abbas, 2012).

	Inmunidad Innata	Inmunidad Adaptativa
Células implicadas	Macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células NK	Linfocitos T y B
Historia evolutiva	Ancestral	Reciente
Inicio	Rápida (minutos/horas)	Lenta (días/semanas)
Especificidad	Estructuras microbianas comunes	Antígenos únicos
Potencia	Puede ser exagerada	Rara vez es exagerada
Memoria	No tiene	Memoria importante
Efectividad	No mejora	Mejora con la exposición

3.1. Receptores Tipo Toll

En el reconocimiento de los patógenos por las células del sistema inmune innato participan receptores específicos denominados PRR (Receptores de Reconocimiento de Patrones) su función es reconocer partes concretas y conservadas de los patógenos, éstos pueden encontrarse en la matriz extracelular, solubles en el citoplasma o anclados a membranas, dentro de este grupo se incluyen los Receptores Tipo Toll (TLR) que se encuentran en el sistema inmune como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, entre otras; son receptores proteicos de membrana, algunos se expresan en la membrana de las células y otros en los compartimentos intracelulares, estos receptores detectan (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos denominados) PAMPs, que son esenciales para la supervivencia y patogenicidad del microorganismo. Así mismo son capaces de reconocer moléculas propias derivadas de tejido lesionado del huésped o moléculas producidas por células que están muriendo por que se liberan sustancias que son una señal de peligro DAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Peligro).

3.1.2 Estructura y Función

Los Receptores Tipo Toll (Toll-Like Receptors, TLR por sus siglas en inglés) deben su nombre por un receptor denominado Toll que fue descubierto en la mosca de fruta (*Drosophila*). Participan en la respuesta inmune innata, son receptores transmembranales de un solo paso, reconocen moléculas específicas denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, de sus siglas en inglés) tales como el Lipopolisacárido (LPS) (Cunningham, 2013),

fracción de bacterias Gram negativas, proteínas de choque térmico, ácido hialurónico, b.defensinas, fibronectina y péptico amiloide (Volkova, 2012) así mismo reconocen patrones moleculares asociados a daño celular (DAMPs, de sus siglas en inglés) derivados de tejido dañado o necrótico, así como ácidos grasos saturados (Bianchi, 2007).

Una vez que el TLR de la superficie celular se une al PAMP microbiano (su ligando) se produce una señal en la célula, provocando una cascada inflamatoria el resultado es un incremento en un factor de transcripción llamado factor nuclear kappa-B (NF- κ B) que activa los genes que codifican para las citocinas, interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α).

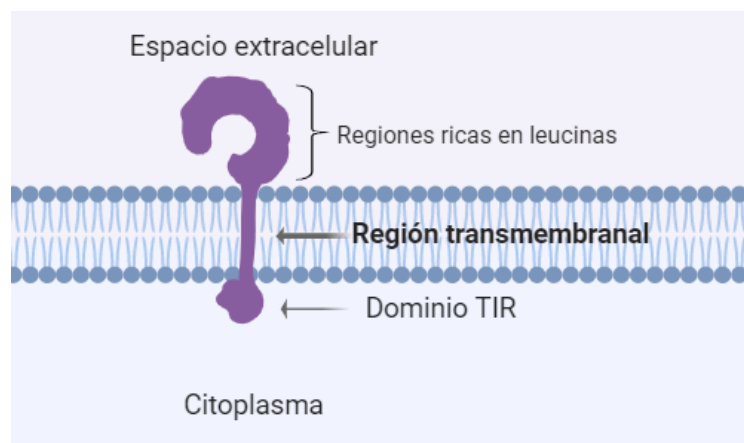


Figura 1. Estructura general de TLR

Los TLRs poseen una región extracelular rica en repeticiones de leucina (LRRs), a través de la cual reconoce a sus ligandos específicos; una región transmembranal, y una región intracelular en donde se localiza el dominio TIR. Dependiendo del ligando reconocido, el dominio TIR reclutará a una proteína adaptadora para la ulterior transducción de señales.

Los TLR son glucoproteínas de membrana de cadena corta tipo 1 que comparten un elemento común en la región extracelular, de 24 a 29 aminoácidos, contienen entre 19 y 25 motivos repetitivos ricos en leucinas (LRR) en su ectodominio, que

es la región transmembranal y una porción intracitoplasmática con dominios TIR que inician la señalización intracelular (Kawasaki and Kawai, 2014).

Se han dividido en dos grandes grupos TLRs de membrana citoplasmática (TLR 1, 2, 4, 5, 6 y 10) y TLRs de membrana endosomal (TLR 3, 7, 8 y 9). Cada TLR reconoce un patrón molecular distinto (Vadillo, 2012).

Están expresados abundantemente en fibroblastos y células epiteliales, así como en células del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B, su expresión es regulada por patógenos, citocinas, ligandos endógenos y factores micro ambientales (Kawasaki and Kawai, 2014), y se expresan en CD, fagocitos, mastocitos y células Natural Killer (células NK), en órganos y su expresión en el timo tiene importancia ya que está implicado en la tolerancia e inmunocompetencia. (Vaure y Liu, 2014).

Participan en el modelamiento de la respuesta inmune adaptativa al inducir en las Células Dendríticas (CD) la secreción de citocinas que actúan sobre los Linfocitos T cooperadores CD4+ o sobre los Linfocitos T citotóxicos CD8+ (Vaure y Liu, 2014).

3.1.3 Cascada de señalización a través de TLR

La estimulación de las células mediante estos receptores activa vías de señalización que amplifican la inmunidad (Vaure y Liu, 2014). Después de la interacción del receptor con su ligando específico, los TLR dimerizan y sufren un

cambio en la estructura, requerido para llevar a cabo el reclutamiento río abajo de moléculas de señalización, tales como el factor de diferenciación mieloide (MyD88, por sus siglas en inglés Myeloid differentiation primary response gene 88), cinasas asociadas con el receptor de interleucina 1 (IL-1) (IRAKs) y cinasas activadas por el factor transformante de crecimiento beta (TGF- β). Cada molécula adaptadora induce vías de señalización intracelular distintas que promueven la activación de factores de transcripción tales como NF- κ B que permiten la transcripción de genes de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y moléculas co-estimuladoras (Vaure y Liu, 2014).

3.1.4 Receptor Tipo Toll 4 (TLR4)

Es un receptor que se expresa en la superficie de la membrana celular, predominantemente en células fagocíticas y es responsable del reconocimiento de lipopolisacáridos (LPS, que es el componente estructural más abundante en bacterias Gram negativas), mananas, glicosilinositolfosfolípidos, proteínas de cápside vírica, proteínas de función del virus sincitial respiratorias (RSV), pneumolisinas estreptococicas y taxol un agente anti tumoral, entre otros. También está implicado en el reconocimiento de ligandos endógenos relacionados con la respuesta inflamatoria independientemente a la presencia de infección (Vaure, 2014). Al unir a su ligando se induce la oligomerización del TLR4 y el reclutamiento río debajo de complejos proteicos, con la interacción con sus dominios TIR (Toll interleukin-1 Receptor), responsables de la transducción de señales, ya que contiene tres regiones que median la interacción de la proteínas de los TLR con las proteínas adaptadoras (Vaure, 2014, Lu y cols, 2008).

Existen cinco proteínas adaptadoras que contienen dominios TIR: MyD88, TIRAP (por sus siglas en inglés TIR domain-containing adaptor protein) a la que también se le conoce como MAL (por sus siglas en inglés (MyD88 adapter-like), TRIF (por sus siglas en inglés TIR domain-containing adaptor inducing IFN- γ), TRAM (por sus siglas en inglés TRIF-related adaptor molecule) y SARM (por sus siglas en inglés Sterile and heat armadillo motifs containing protein).

TLR 4 es el único de todos los TLR que utiliza todas las proteínas adaptadoras (Lu y cols., 2008, Park y cols., 2009) Cuando se estimula TLR4 se pueden activar dos vías:

1. Vía dependiente de MyD88, que activa a NF- κ B provocando la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 y TNF- α (Figura 1).
2. Vía independiente de MyD88, que activa IRF3 (por sus siglas en inglés Interferon Regulatory Factor 3), provocando la producción de IFN- γ (Interferón- γ) y permite la expresión de genes inducibles por IFN, posteriormente se activa NF- κ B (Figura 2).

La activación de la cascada de señalización de TLR4/NF- κ B conlleva la liberación de citocinas pro-inflamatorias.

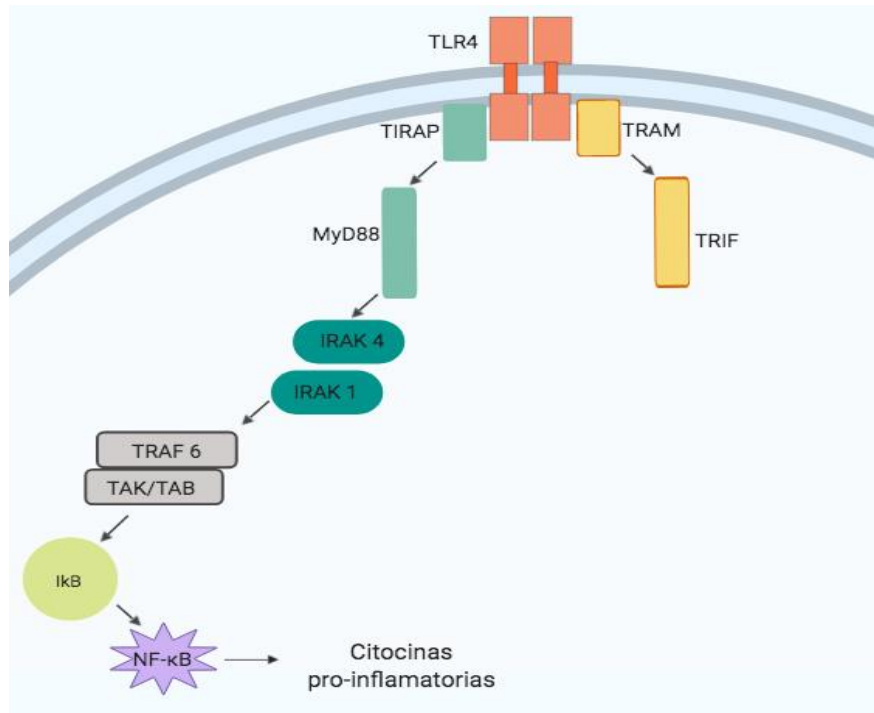


Figura 1. Vía de señalización de TLR4 dependiente de MyD88.

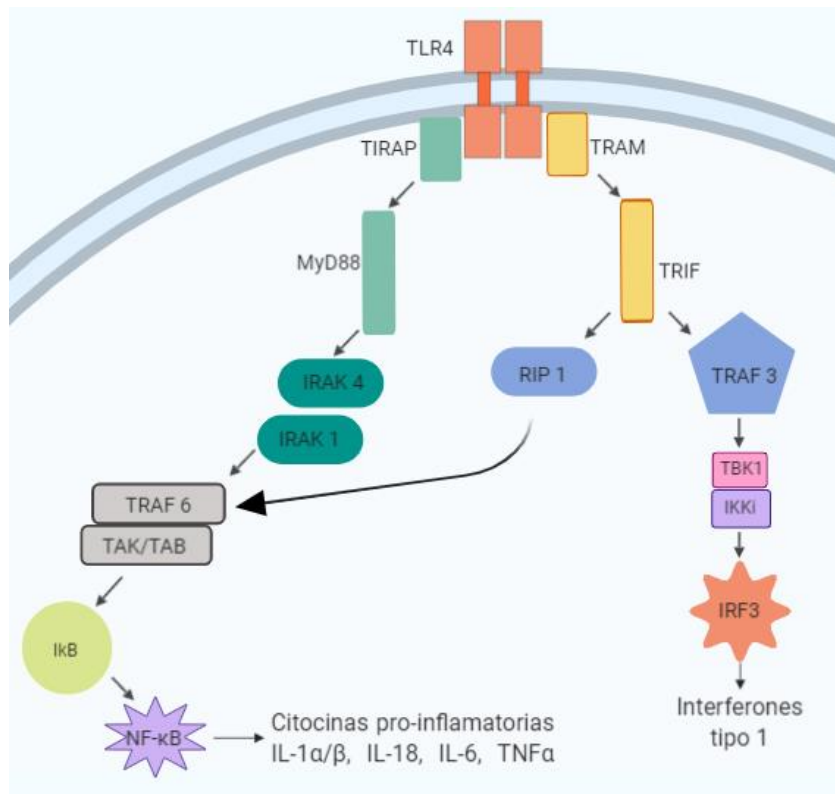


Figura 2. Vía de señalización de TLR4 independiente de MyD88.

Los TLRs se han visto también asociados con procesos inflamatorios a través del reconocimiento de DAMPs de tipo lipídico durante el envejecimiento fisiológico.

La inmunidad adquirida y en particular los linfocitos T disminuyen su número y funcionalidad con la edad, siendo que estos cambios están relacionados con la involución del órgano responsable de madurar estas células, proceso en el cual los TLRs están relacionados. (Pasare 2005)

3.2. Linfocitos T

Los linfocitos T se originan a partir de una célula precursora hematopoyética (Stem cell); de dicha célula precursora se originan la Unidad Formadora de Colonias (UFC) que dará origen a la línea eritroidea, mieloidea y el precursor linfoideo. A partir de este precursor se originan las células que serán linfocitos B y/o linfocitos T que posteriormente migran al timo siendo el sitio donde estas células, llamadas timocitos se dividen y diferencian rápidamente (Tizard, 2009). Tanto los linfocitos T CD8+ como los CD4+ se originan a partir de un progenitor que carece de ambos receptores y que es denominado como doble negativo. El timo juega un papel de suma importancia en la diferenciación de linfocitos, ya que es aquí donde las células migran hacia su corteza donde adquieren tanto el marcador CD4 como el CD8, llamadas células doble positivas.

Dependiendo de estímulos recibidos por la célula dendrítica del timo que presenta antígenos propios se da la selección positiva de los TCR que son capaces de reconocer las MHC propias, y la selección negativa de los TCR que

reconocen con alta afinidad a las MHC que presentan antígenos propios. (Pearse, 2006)

Cuando se producen nuevos timocitos, se lleva a cabo una primera fase de selección positiva, donde sólo sobreviven alrededor del 5% en roedores (Dyce, 2007). Los timocitos deben ser capaces de reconocer antígenos extraños, y no deben responder a los componentes normales del organismo (autoantígenos), mientras que los otros mueren por muerte celular programada llamada apoptosis. Sigue una segunda fase de selección negativa, en la cual sólo sobreviven aquellos timocitos que no reconocen lo propio es decir que no son autoreactivos (Tizard, 2009; Rezzani y cols, 2014). Por lo tanto el timo es el órgano linfoide responsable de la tolerancia inmunológica a antígenos propio, ya que los linfocitos T que responden a estos antígenos morirán.

El sistema asegura que los linfocitos T que abandonen el timo no responderán a los componentes normales del organismo montando una respuesta inmune y éstas células que sobreviven pueden abandonar el timo como linfocitos T maduros y circular al torrente sanguíneo para colonizar los órganos linfoides secundarios (Tizard, 2009). Dentro de las múltiples señales que regulan la diferenciación de los timocitos hacia linfocitos T inmunocompetentes, existe el papel de los Receptores Tipo Toll (TLR's, por sus siglas en inglés) en el desarrollo de la tolerancia y competencia inmunológica (Jin y cols, 2014).

3.3. El timo y la maduración de linfocitos T

Etimológicamente el término timo proviene de la palabra griega *thymos*, que significa alma o espíritu. (Jacobs, 1999). El timo es el primer órgano linfoide que se forma y crece inmediatamente después del nacimiento y debido a la demanda de linfocitos T maduros, en la rata el crecimiento del timo continúa hasta la madurez sexual (Pearse, 2006).

En 1961 durante su post doctorado el Dr. Miller realizó la timectomía a un ratón inmediatamente después del nacimiento del animal en el cual se presentó un pobre desarrollo del tejido linfoide, una baja respuesta inmune, y mayor susceptibilidad a infecciones (Miller 2002). El timo es mayormente funcional en animales jóvenes ya que en adultos comienza a contraerse la porción cervical cuando éstos alcanzan la pubertad (Dyce, 2007), es posible encontrarlo como un vestigio que consta primordialmente de grasa y elementos fibrosos, con disminución y/o supresión del tejido tímico.

A este proceso se le conoce como involución del timo, es dependiente de la edad y está conservado en todos los vertebrados (Shanley y cols, 2009).

Dicha involución del timo desde la etapa adulta hasta la senescencia ha sido asociada con una disminución en la producción de linfocitos T inmunocompetentes llamada inmunosenescencia (Rezzani y cols, 2014).

3.3.1 Estructura

El timo se encuentra dividido en corteza y médula. El timo se encarga de producir linfocitos T inmunocompetentes, los cuáles entran al torrente sanguíneo para

distribuirse en los órganos linfoides periféricos donde se asientan y multiplican (Dyce, 2007; Tizard 2009).

Es de origen par en la tercera bolsa faríngea en la cavidad torácica de la región anterior del mediastino en la posición craneal con respecto al corazón, es bilobulado, cada lóbulo se divide en múltiples lóbulos por medio de tabiques fibrosos llamados trábeculas. Cada lóbulo consta de una corteza externa y una médula interna en la cual se encuentra una gran cantidad de linfocitos T maduros asociados a otras células que contribuyen a la maduración de los linfocitos T inmaduros, como las células dendríticas, macrófagos y células epiteliales. La corteza contiene un cúmulo denso de linfocitos T inmaduros y células epiteliales. Dentro del timo se encuentran dispersas las células epitelioideas no linfáticas que contienen abundante citoplasma, las células epiteliales de la corteza tímica proporcionan la interleucina 7 (IL-7) que es necesaria para el desarrollo de linfocitos T en fases tempranas. De las células epitelioideas se deriva un subgrupo que se encuentran únicamente en la médula llamadas células epitelioideas medulares tímicas cuya función es la presentación de antígenos propios a los linfocitos T en la etapa de desarrollo y provocan su eliminación, gracias a este proceso el sistema inmune tolera lo propio.

3.3.2 Función

El timo es un órgano linfoide primario, responsable de la selección y diferenciación de linfocitos T. Las células epiteliales corticomedulares del timo contienen linfocitos T, linfocitos B, células plasmáticas y células neuroendócrinas, entre otras (Dyce, 2007; Tizard 2009). Los linfoblastos o

protimocitos migran de la médula ósea y entran al timo gracias a la unión corticomedular, ahí se llevan a cabo las cuatro etapas de maduración para llegar a la circulación como células T periféricas maduras. (Brujintjes, 1993)

3.3.3 Involución tímica

La involución del timo es considerado un proceso fisiológico multifactorial que comienza en la niñez en el humano y en la pubertad en roedores, cuando hay disminución en el tamaño del timo y tejido adiposo invade la periferia de los lóbulos. Es responsable de que la función inmune vaya disminuyendo con la edad, por lo que se reduce la producción de células T periféricas, y células T vírgenes, pero hay un aumento de células T de memoria. Esto lleva a la reducción de la inmunidad mediada por células T, por lo que hay un incremento en la susceptibilidad a infecciones, enfermedades, neoplasias y enfermedades autoinmunes (Castle, 2000, Caruso 2009). A este proceso se le conoce como “inmunosenescencia” (Makinodan, Rezzani y cols, 2014, Pawelec, 2018).

3.4 Inmunosenescencia

La inmunosenescencia es un proceso provocado por el sistema inmune innato y adaptativo en individuos de edad avanzada. Sin embargo, el timo es también un órgano endocrino que produce y secreta moléculas que constituyen procesos como el desarrollo y la migración de los timocitos, así mismo regula el número de células T, por lo que un desequilibrio endocrino se puede considerar factor de la inmunosenescencia (Palmer, D. B. (2013).

Los elevados niveles de citocinas pro-inflamatorias conllevan al desarrollo de patologías, la involución del timo se amplifica de forma crónica, se lleva a cabo

una inflamación durante el envejecimiento mediante la liberación de células T auto-reactivas capaces de infiltrarse y generar respuestas inflamatorias en tejidos no linfoides. El envejecimiento también conlleva a la acumulación de células senescentes que provocan una inflamación crónica (Amiya, 2017).

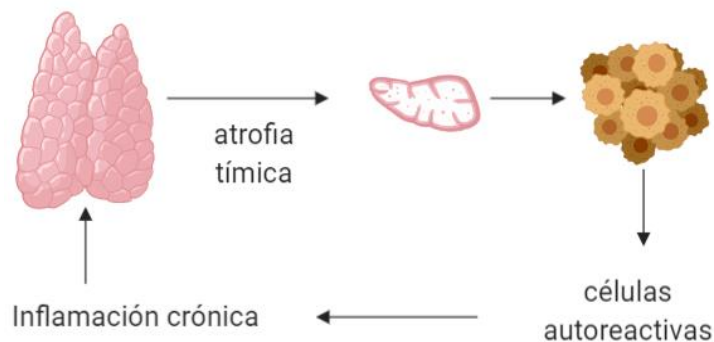


Figura 3 Adaptada de Savino W. 2017

La atrofia tímica amplifica la inflamación crónica asociada al envejecimiento mediante la liberación de células T autorreactivas que conduce a la producción y secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6.

Las citocinas son pieza clave en este proceso de envejecimiento inflamatorio, con funciones tanto inflamatorias como anti-inflamatorias.

El estado de inflamación crónica nos ayuda lograr comprender el envejecimiento así como las respuestas anti-inflamatorias y el proceso de longevidad. Dentro de estas citocinas, hay algunas que ejercen efectos pro-inflamatorios como el TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-22, IL-23; otras con efectos anti-inflamatorios como la IL-1RA, IL-4, IL-10; y los mediadores de citocinas entre los que se encuentran la lipoxina A4 y la proteína de choque por calor.

Todo ello para crear un estado de equilibrio entre ambas respuestas pro-inflamatoria y/o anti-inflamatoria (Alcalá-Pérez D, 2018). La inflamación del tejido

adiposo está asociada con la edad (Amiya, 2017). La inflamación crónica se caracteriza por un aumento de la producción de IFN-g, IL-6 y TNF- α . En un estudio donde se administró IL-6 en ratones jóvenes se indujo la involución tímica aguda y una reducción significativa de células T periféricas (Savino W, 2017).

Existen evidencias del papel que juegan los TLR's en condiciones tales como la inflamación, en donde su expresión se encuentra aumentada (Hausmann y cols, 2002). Más aún, se ha identificado el papel que juegan los TLRs en desórdenes de tipo inflamatorio al ser activados por los DAMPs y en particular como parte clave de la inmunosenescencia (Jose, 2017). De hecho, se ha acuñado el término de "inflammaging" al asociar la inflamación de tejidos con el envejecimiento (Franceschi, 2000). Durante el proceso fisiológico de la senescencia en el timo, hay una disminución de células del tejido epitelial y de timocitos en contraste con un aumento de adipocitos y de ácidos grasos considerados lipotóxicos, tales como ceramidas (Dixit, 2010). Se ha demostrado una asociación entre los DAMPs de tipo lipídico y la involución del timo (Dixit, 2012).

La acumulación de ceramidas en macrófagos del timo se asocia con la activación de proteínas involucradas en apoptosis como la caspasa 1 responsable de la síntesis de IL-1 β : conocido como complejo del inflammasoma-dependiente de caspasa 1 o inflammasoma Nlrp3, este aumento de IL-1 β lleva a la atrofia e involución del timo, ya que si se elimina la expresión de Nlrp3, se protege al timo de la involución (Dixit y cols, 2012, Youm y cols, 2012).

Recientemente se ha encontrado que los TLRs son algunos de los receptores capaces de reconocer estos DAMPs, en particular el TLR4 (Dixit, 2012; Jose, 2017; Lee, 2009). Sin embargo, se desconoce el papel que juega este receptor en la senescencia del timo. Por lo tanto, nos centraremos en el estudio de la expresión del receptor TLR4 en el timo de la rata desde la etapa neonatal y hasta la inmunosenescencia.

4. JUSTIFICACIÓN

El proceso de envejecimiento es responsable de cambios en el sistema inmune que afectan su morfología, funcionamiento y desarrollo, dichos cambios pueden manifestarse desde la linfopoyesis hasta la respuesta esperada del sistema inmune en los órganos linfoides frente a un proceso de enfermedad o agente infeccioso.

Tanto la inmunidad innata como adaptativa se afectan con el envejecimiento lo que genera un impacto negativo en la respuesta inmune de los ancianos y de modelos animales senescentes, y los predispone a padecer enfermedades infecciosas (Saavedra, 2014)

El timo es la mayor fuente de linfocitos T del organismo, así como el sitio de maduración y diferenciación de las células T, por lo que es nombrado “el reloj inmunológico del envejecimiento” (García, 2006). La involución del timo que provoca la disminución de la salida de linfocitos T es un cambio crítico que ocurre en el sistema inmunitario con el envejecimiento. En esta etapa llamada inmunosenescencia, se ha observado una acumulación de sustancias lipotóxicas

que lleva a un aumento de procesos inflamatorios en el timo que llevan a la atrofia de este órgano.

Estas moléculas lipídicas que forman parte de los DAMPs son ligandos de los receptores TLR, y en particular el TLR4, sin embargo se desconoce si este receptor está implicado en la involución del timo.

Por lo que nuestra pregunta de investigación es si existen cambios en la expresión de la proteína TLR4 y/o en la cascada de señalización de ésta, que se encuentren asociados con la edad que pudieran alterar las funciones del timo.

Nuestro interés dentro de la evaluación de la inmunidad adaptativa desde la etapa neonatal hasta la inmunosenescencia se centra entonces en estudiar la expresión de los TLR4 en éstas etapas particularmente considerando la inmunosenescencia como una inflamación crónica fisiológica (Dixit, 2012).

5. HIPÓTESIS

La expresión del TLR4 disminuye a lo largo de la vida de la rata asociado con la involución del timo.

6. OBJETIVO

6.1 Objetivo general

Identificar la presencia del receptor TLR4 en el timo de la rata Wistar a lo largo de todas las etapas de la vida de la rata (la neonatal, la pubertad, la adultez y la senescencia), mediante la técnica de Inmuno Blot, para asociarlo con la involución del timo y la maduración de linfocitos T.

6.2 Objetivos particulares

- Estandarizar la técnica de InmunoBlot.
- Determinar la expresión de TLR4 en extractos de proteína del timo de la rata Wistar en cuatro etapas, neonatal, puberal, adultez y senescencia.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Diseño experimental.

Los timos fueron un donativo de ratas excedentes macho Wistar del bioterio del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

Para el estudio se obtuvieron timos en cuatro etapas: la etapa neonatal (0 días de vida); la etapa puberal (45 a 60 días de vida); la etapa adulta (100 a 110 días de vida); la etapa senescente (560 a 580 días de vida). n= 6/etapa.

En cada etapa de estudio se analizaron seis extractos independientes

Grupo de estudio Rata Macho Wistar



Figura 4. Descripción de los 4 grupos de estudio con respecto a la edad. (Sengupta, 2013).

7.2 Lisis del timo

El timo se aisló y fue colocado en una caja de petri que contenía 3 mL de medio cultivo RPMI 1640 estéril y frío, finalmente el órgano se disgregó mecánicamente sobre escamas de hielo para obtener los timocitos. Una vez obtenido y conservado el extracto celular a 4°C se realizó una centrifugación a 1200 rpm a 4°C, durante seis minutos, se desechó el sobrenadante y se conservó el botón celular, posteriormente se agregó amortiguador de lisis para eritrocitos y se repitieron estos pasos hasta que el sobrenadante perdió la turbidez y se observó color transparente, indicando la ausencia de tejido y sangre.

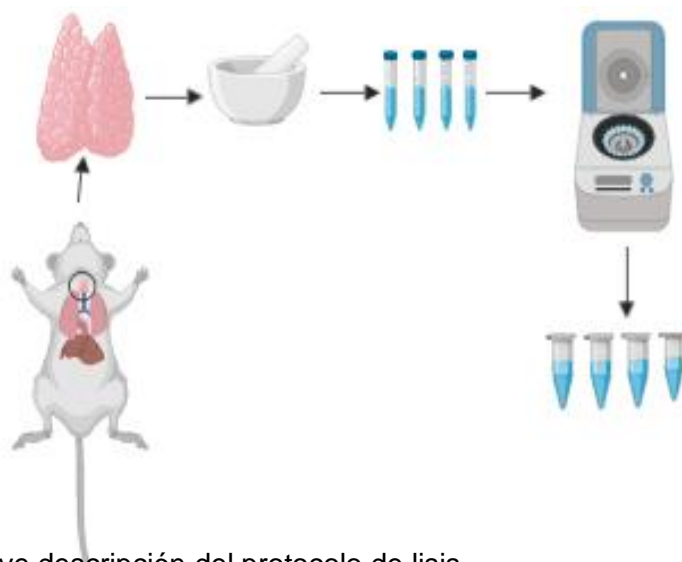


Fig. 5. Breve descripción del protocolo de lisis.

Se obtuvo el timo que se disgregó mecánicamente para realizar los lavados con solución de lisis hasta obtener las proteínas totales.

Una vez obtenida la mayor cantidad de timocitos se extrajeron las proteínas totales para ello, el extracto celular se le adiciono amortiguador de lisis A (ver apéndice) y se homogeneizó con ayuda de la micropipeta y se incubó durante 20 min en hielo. Posteriormente se realizó una centrifugación a 14,000 rpm, 4°C y se recuperó el sobrenadante que se conservó a -20°C hasta su determinación por el método de Bradford

7.3 Cuantificación de proteínas totales

La determinación de las proteínas totales de timo de la rata se realizó con el método de Bradford. En breve, en una placa de 96 pozos de fondo plano para ELISA, se llevó a cabo la cuantificación de proteínas de acuerdo al protocolo descrito a continuación. Se colocó albúmina como proteína estándar que se disolvió en amortiguador de lisis A.

	Concentración albúmina	Reactivo de Bradford
A1, B1	----	250 μ L
C1, D1	0.1 mg/ml	250 μ L
E1, F1	0.25 mg/ml	250 μ L
G1, H1	0.5 mg/ml	250 μ L
A2, B2	0.75 mg/ml	250 μ L
C2, D2	1.0 mg/ml	250 μ L
E2, F2	1.25 mg/ml	250 μ L
G2, H2	1.5 mg/ml	250 μ L

Cuadro 1. Sistema de concentraciones establecidas de albúmina (Curva estándar): 5 μ L de la concentración correspondiente y 250 μ L de reactivo de Bradford.

Se agregaron las concentraciones de albúmina establecidas de la curva estándar y el reactivo de Bradford, todas por duplicado en la placa. Se colocó la muestra a cuantificar por triplicado, a partir del pozo A3, hasta el pozo H11, agregando 5µL de muestra y 250 µL de reactivo de Bradford.

Al observarse una coloración fuera de la curva estándar se realizó una dilución de la muestra 1:10, donde se colocó en un tubo Eppendorf 9 µL de Solución de lisis A y 1 µL de muestra. Las muestra diluidas se realizaron por triplicado, 5µL de muestra dilución 1:10 y 250 µL de reactivo de Bradford.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco	0.7 5	N1	N3	N6	P3	P5	A2	A5	S1	S4	/
B	Blanco	0.7 5	N1	N4	N6	P3	P6	A2	A5	S2	S4	/
C	0.1	1.0	N1	N4	P1	P3	P6	A3	A5	S2	S5	/
D	0.1	1.0	N2	N4	P1	P4	P6	A3	A6	S2	S5	/
E	0.25	1.2 5	N2	N5	P1	P4	A1	A3	A6	S3	S5	/
F	0.25	1.2 5	N2	N5	P2	P4	A1	A4	A6	S3	S6	/
G	0.5	1.5	N3	N5	P2	P5	A1	A4	S1	S3	S6	/
H	0.5	1.5	N3	N6	P2	P5	A2	A4	S1	S4	S6	/

Cuadro 2. Asignación de pozos para curva estándar de albúmina y muestras problema a cuantificar por el método de Bradford.

Se llevó a cabo la lectura en el espectrofotómetro (Xmark-biorad) a una λ de 595 nm. Se obtuvo el gráfico de la curva estándar y la ecuación, para obtener la cuantificación por regresión lineal.

7.4 Preparación de muestras de proteínas totales para SDS-PAGE

Previo al estudio electroforético, cada muestra (20 μ g de proteína total) recibió 40 μ L de Laemmli 5X y 4 μ L de DTT 0.1 M, posteriormente cada muestra se calentó a ebullición por 5 minutos en un baño maría y finalmente cada muestra se mantuvo a -20° C hasta su análisis.

7.5 Separación de proteínas mediante gel de electroforesis desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Para el análisis electroforético de cada muestra se realizó el procedimiento de Laemmli, 1979, para ello se ensamblaron los vidrios para geles de poliacrilamida. Se prepararon 20 mL de la solución para el gel separador de electroforesis desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15 % como se indica en la tabla adicionando en orden los componentes. Se agregaron 7.5 mL a cada placa de la solución para gel separador al 15% con ayuda de una micropipeta, dejando caer la solución por una de las esquinas de la placa de vidrio. Se adicionaron 200 μ L de H₂O miliQ a cada gel, por una esquina del vidrio, para romper la tensión superficial y permitir la polimerización de forma horizontal. Dejando polimerizar por un mínimo de 40 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de polimerización, se decantó el agua en la tarja y se secó el sobrante con papel filtro. Se prepararon 10 mL de la solución para el gel concentrador de

electroforesis desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 5% como se indica en la Tabla , adicionando en orden los componentes. Se agregaron 3.5 mL a cada gel de la solución para gel concentrador con ayuda de una pipeta por una esquina de la placa de vidrio evitando la formación de burbujas.

Se colocaron los peines de 1.5 mm entre las placas de vidrio.

Se dejaron polimerizar por un mínimo de 20 minutos. Se retiraron los peines; así mismo, se retiraron del soporte de polimerización el marco de la placa y se desmontaron las placas de vidrio, de tal forma que no se despegaran los vidrios de los geles. Se ensambló la cámara de electroforesis, adicionando buffer de electroforesis 1X en el espacio entre las dos placas del marco de sujeción hasta casi derramar.

Se cargaron los carriles del Gel A y el gel B con las muestras de lisados totales de timo, se agregó marcador de peso molecular (PM Dual Color, Biorad). Se agregó amortiguador de electroforesis 1X en la parte externa del marco de sujeción hasta quedar completamente cubierto el electrodo. Se colocó la tapa de la cámara de electroforesis, se ajustó a 100V durante 20 minutos, se detuvo y se ajustó a 170V para llevar a cabo la separación de proteínas, una vez que el frente de migración llegó a la parte inferior del marco de sujeción se detuvo para dar por finalizada la electroforesis.

COMPONENTE	4 geles (20mL)
H2O Mili Q	4.6 mL

COMPONENETE	4 geles (20mL)
Tris HCl 1.5M pH 8.8	5 mL
SDS 10%	200 μ L
Acrilamida 30%	10 mL
PSA 10%	200 μ l
TEMED	8 μ l

Cuadro 1. SDS-PAGE: Gel separador acrilamida/bisacrilamida 15%

COMPONENETE	4 geles (10mL)
H2O Mili Q	6.80 mL
Tris HCl 1.5M pH 8.8	1.248 mL
SDS 10%	100 μ L
Acrilamida 30%	1.70 mL
PSA 10%	100 μ l
TEMED	10 μ l

Cuadro 2. SDS-PAGE: Gel concentrador acrilamida/bisacrilamida 5%

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
-	PM	N1	P1	A1	S1	N2	P2	A2	S2	N3	P3	A3	S3	-

Cuadro 3. Orden de las muestras Gel A

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
-	PM	N4	P4	A4	S4	N5	P5	A5	S5	N6	P6	A6	S6	-

Cuadro 4. Orden de las muestras Gel B

7.6 Transferencia de proteínas

La transferencia de proteínas se realiza de acuerdo al método de Towbin et al. 1979 en una membrana de nitrocelulosa con alta afinidad a las proteínas (Amersham Protran Nitrocellulose Blotting Membrane 0.45 μm , 300mm x 4m, número de catálogo 10600002). Hay dos tipos de membrana PVDF (mayor afinidad a proteínas sin embargo hay que hidratar con metanol pero es altamente tóxica) y nitrocelulosa fue suficiente para la cantidad de proteínas.

Se retiran las placas con los geles, quitan los vidrios y se sumergen los geles con el vidrio, se adiciona buffer de transferencia 1X frío, para separaron ambos geles con ayuda de una cuchilla plástica cortando la parte que corresponde al gel concentrador.

Se debe realizar un sandwich por lo que en un recipiente largo se agregó buffer de transferencia 1X frío para colocar los cassettes de transferencia, cuatro esponjas de transferencia, cuatro hojas de papel filtro de 6x8 cm y dos membranas de nitrocelulosa de 6x8cm. Sobre el polo negativo (color negro) se debe colocar con el material previamente mencionado que estuvo sumergido en el buffer de transferencia 1X en el siguiente orden: esponja de transferencia, papel filtro, gel A, membrana de nitrocelulosa, papel filtro y esponja de transferencia. Se realiza el mismo procedimiento con el gel B. Se ensambló la cámara de transferencia y se agregó buffer de transferencia 1X frío hasta casi llenar la cámara, se dejan libres 2 cm de la parte superior y se colocó un refrigerante. Se cerró la cámara y se ajustó a 100V por lo menos una hora a 4°C. Una vez que transcurrió el tiempo se apagó la fuente de poder y se procedió a desmontar la cámara de transferencia. Se realizó el lavado de la membrana de nitrocelulosa con TBS-T por un minuto dentro del recipiente.

7.7 Tinción de membrana con Rojo Ponceau

Para verificar que la transferencia de proteínas se realizó, se llevó a cabo la tinción con Rojo Ponceau (Sigma Aldrich). Se agregaron 20 ml aproximadamente del colorante en un recipiente, se sumergieron las membranas de nitrocelulosa cada una por separado durante cinco minutos. Con el uso de un bolígrafo se realizaron las marcas correspondientes a las bandas del marcador de peso molecular (PM). Se realizó el enjuague de las membranas con H₂O MiliQ dos veces posteriormente se realizó con TBS-T hasta que se eliminó por completo el colorante.

7.8 Bloqueo de membranas

Con el fin de disminuir el fondo en la membrana de nitrocelulosa se bloqueó cada membrana con una solución TBS-T que contenía 5% de leche descremada. Para la solución de bloqueo, se pesó 1 g de Leche descremada y se disolvió en 20 mL de TBS-T, en un vaso de precipitado de 25 mL, se homogenizó con agitador magnético. Se introdujo cada membrana en recipientes distintos con 10 mL de la solución de bloqueo (leche 5 %), se incubó durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante. Una vez terminada la incubación, se desechó la solución de bloqueo y se realizaron dos lavados con TBS-T (cada uno de 2 minutos).

7.9 Inmuno blot

Todos los anticuerpos primarios que se analizaron en este estudio se prepararon en una solución de Starting block (Thermo Fischer Scientific) que contenía azida de sodio al 0.05%. Los anticuerpos primarios utilizados se diluyeron 1:1000.

EL anti-TLR4 monoclonal de ratón, Santa Cruz Biotechnology, Inc. #293072)

reconoce una proteína de peso molecular entre 95 a 120 kDa;

Policlonal de conejo anti- β -actina dilución 1:5000 (Abcam).

Anticuerpos secundarios: anti-IgG de ratón y de conejo acoplados a peroxidasa de rábano (Jackson Immunoresearch) dilución 1:10,000.

Dilución de Anticuerpos:

Vol. Ab=Vol. final / Dilución

Obtenida la cantidad de anticuerpo se diluyen con el volumen deseado en albúmina-TBS-T-azida de sodio 0.025% o leche 5% ó solución de bloqueo (Thermo Scientific Starting Block).Se incubó cada membrana de nitrocelulosa

con los anticuerpos primarios y secundarios en las condiciones adecuadas para ellos. Entre cada anticuerpo se realizaron 6 lavados con TBS-T; cada lavado con una duración de 5 minutos.

7.10 Revelado

Todo el proceso de revelado se lleva a cabo en el cuarto oscuro.

Se utilizaron dos sustratos ya que no todos los anticuerpos utilizados son sensibles al mismo sustrato.

Sustrato quimioluminescente "Thermo Scientific" SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate.

Sustrato Thermo Scientific SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate.

Se coloca en un recipiente solución reveladora, en otro recipiente agua corriente y en un tercer recipiente solución fijadora.

Cada membrana se colocó en un recipiente con el respectivo sustrato, debe quedar en contacto el sustrato y las proteínas de la membrana por lo que nos ayudamos de una pinza, sin tocar la zona donde se encuentran las proteínas, se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se eliminó el exceso de sustrato con una servitoalla y se colocaron las membranas dentro del acetato que se encuentra en el cassette de revelado. Se debe verificar que no exista ningún equipo prendido encendido, así como focos o cualquier tipo de luz esto para evitar que se velen las placas radiográficas (Hyperfilm ECL, Amersham), una vez que se rectificó que no exista ninguna luz se encendió la lámpara de luz roja, se cortó la placa del tamaño requerido. Se colocaron dentro del cassette dos hojas de acetato adheridos a las paredes del cassette, se colocó

la membrana de nitrocelulosa dentro de las hojas de acetato, una vez que se encuentra la membrana cubierta por el acetato, se colocó la placa autoradiográfica y se cerró el cassette.

Se realizaron exposiciones de un minuto hasta diez minutos.

Se retiraron las placas para introducirlas al recipiente que contiene la solución fijadora reveladora durante 20 segundos, posteriormente se enjuaga sumergiéndola en el recipiente de agua corriente, posteriormente se introdujo durante cinco minutos en la solución fijadora, por último se enjuaga en el recipiente que contiene agua corriente y se dejaron secar.

Las placas autoradiográficas se etiquetan para identificarlas con el tiempo de exposición y se marcaron los pesos moleculares.

7.11 Análisis densitométrico de las proteínas

Con el uso de las placas de revelado de ECL del Inmunoblot, se utilizó el programa Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>?) para cuantificar la intensidad de señal de las bandas de interés, normalizando con respecto a la expresión de un control interno, la proteína β -actina.

7.12 Análisis Estadístico

Los datos de la densitometría de las bandas observadas en las placas de ECL fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media (n=6 para cada grupo) y se realizó una comparación entre los cuatro grupos de estudio utilizando el análisis de varianza ANOVA, con el programa GraphPad Prism versión 5.

8. RESULTADOS

8.1 Validación del modelo de la detección de TLR4

Con el fin de obtener como resultado la expresión de TLR4 en el timo primero se estandarizó la técnica de Inmuno Blot. Para esto se utilizaron diferentes anticuerpos policlonales anti-TLR4 se titularon el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario para obtener la dilución idónea, a partir de muestras de bazo y timo donados por parte de un proyecto con número de registro: 2018-1-141; previamente aprobado en el INPer.

En la (figura 6A) se observa una banda de alrededor de 60 kDa detectada por el anticuerpo anti-TLR4 (H-80) lo cual no corresponde al peso esperado para el TLR4 completo que es de 95 kDa, mientras que en la (figura 6B), no se observa ninguna banda con el anticuerpo anti-TLR4 (76B357.1). En el inmunoblot con el anticuerpo anti-TLR4 (293072) se puede ver una banda alrededor de 100 kDa, correspondiente al peso esperado para TLR4 (Figura 6C). Con este resultado se decidió utilizar el anticuerpo TLR4 (293072), posteriormente se estableció la dilución final a utilizar con las muestras de los timos del modelo experimental.

La expresión de TLR4 en el timo de ratas Wistar macho de las cuatro etapas se analizó mediante inmunoblot, habiendo previamente normalizado con respecto a un control interno, la proteína β -actina Fig 6.

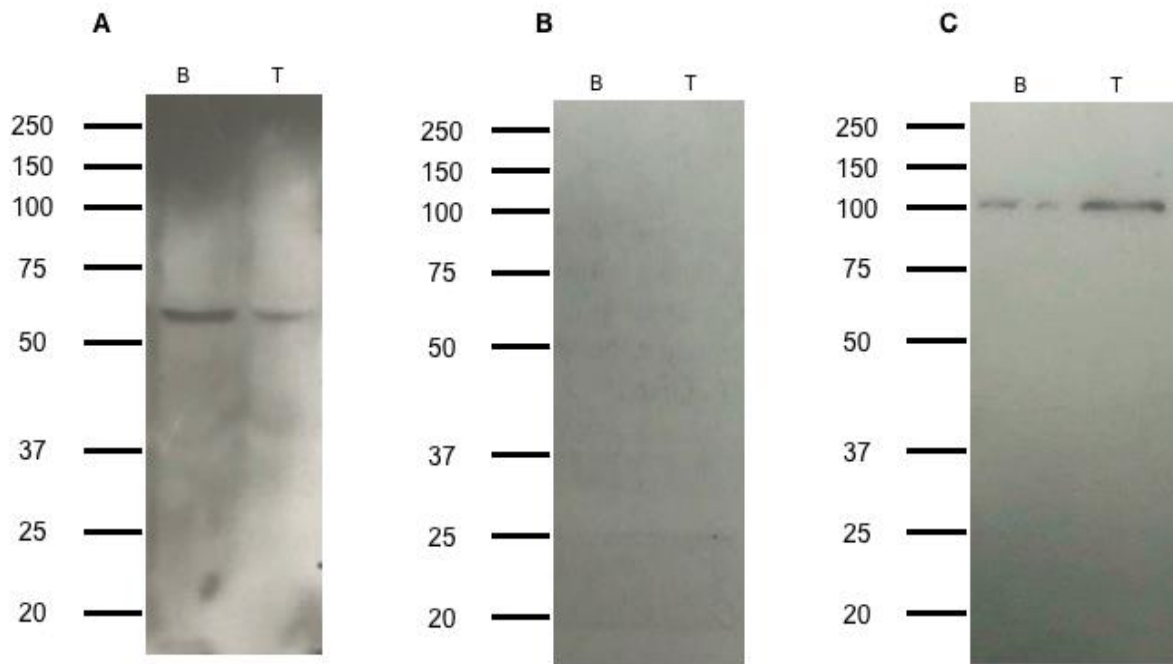


Figura 6. Inmunoblot TLR4. Se incubaron las membranas de nitrocelulosa con proteínas totales de Bazo (B) y de timo (T) con los anticuerpos: (A) anti-TLR4 (H-80) de laboratorio Santa Cruz:10741 dilución (1:2000), (B) anti-TLR4 (768357.1) de Laboratorio Santa Cruz-52962 (1:1000) y (C) anti-TLR4 (25) de Laboratorio Santa Cruz-293072 dilución (1:1000).

Se realizó un control positivo con muestra de bazo, donde anteriormente se ha observado la presencia de TLR4 (Li, 2016) con el fin de verificar que la banda observada en el inmunoblot corresponde al anticuerpo policlonal TLR 4, en la figura 7 se puede observar dicho inmunoblot.

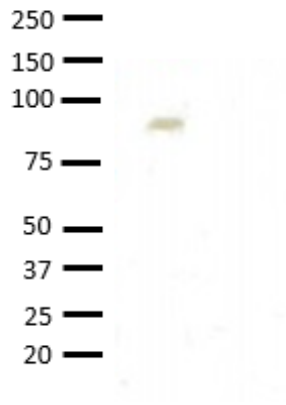


Figura 7. Control positivo Inmunoblot TLR4. Se incubó la membrana de nitrocelulosa con proteínas totales de Bazo (B) con el anticuerpo anti-TLR4 (25) de Laboratorio Santa Cruz-293072 dilución (1:1000).

Se realizó la técnica de inmunoblot con muestra de timo incubando únicamente el anticuerpo policlonal secundario, para descartar que si se observaba una banda con un peso de 95 kDa, ésta fuera un artefacto, en la figura 8 se puede observar la ausencia de bandas, con esto se puede concluir que la presencia de las bandas en 95 kDa si pertenece a la expresión del anticuerpo policlonal TLR4.



Figura 8. Control negativo Inmunoblot TLR4. Se incubaron las membranas de nitrocelulosa con proteínas totales de timo (T) sin el anticuerpo anti-TLR4 (25) de Laboratorio Santa Cruz-293072 dilución (1:1000) α Ms dilución (1:5000). No se mostró reacción positiva del anticuerpo secundario

En la figura 9 se observa la membrana de nitrocelulosa con la presencia de todas las bandas así como el orden en que incubaron las muestras de timocitos.

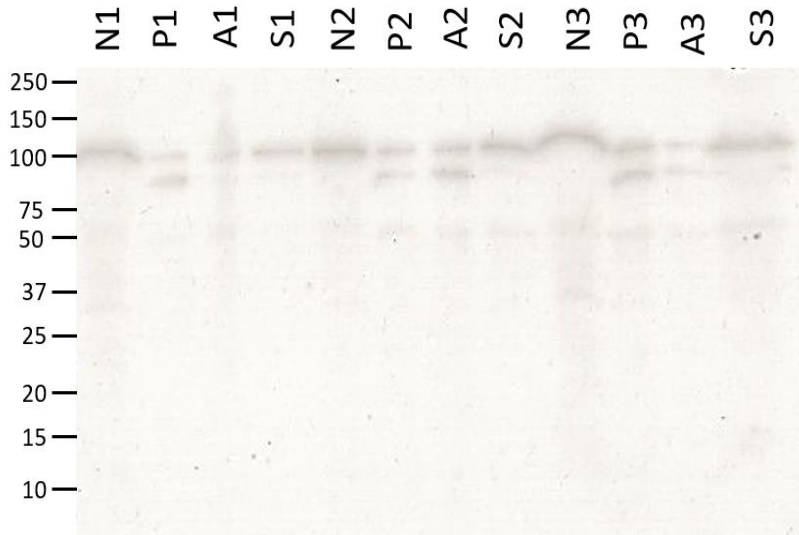


Figura 9. Inmunoblot TLR4. Se incubó la membrana de nitrocelulosa con proteínas totales de Timocitos (T) con el anticuerpo anti-TLR4 (25) de Laboratorio Santa Cruz-293072 dilución (1:1000), en todas las etapas de la vida de la rata. (N) Neonato, (P) Púber, (A) Adulto, (S) Senescente.

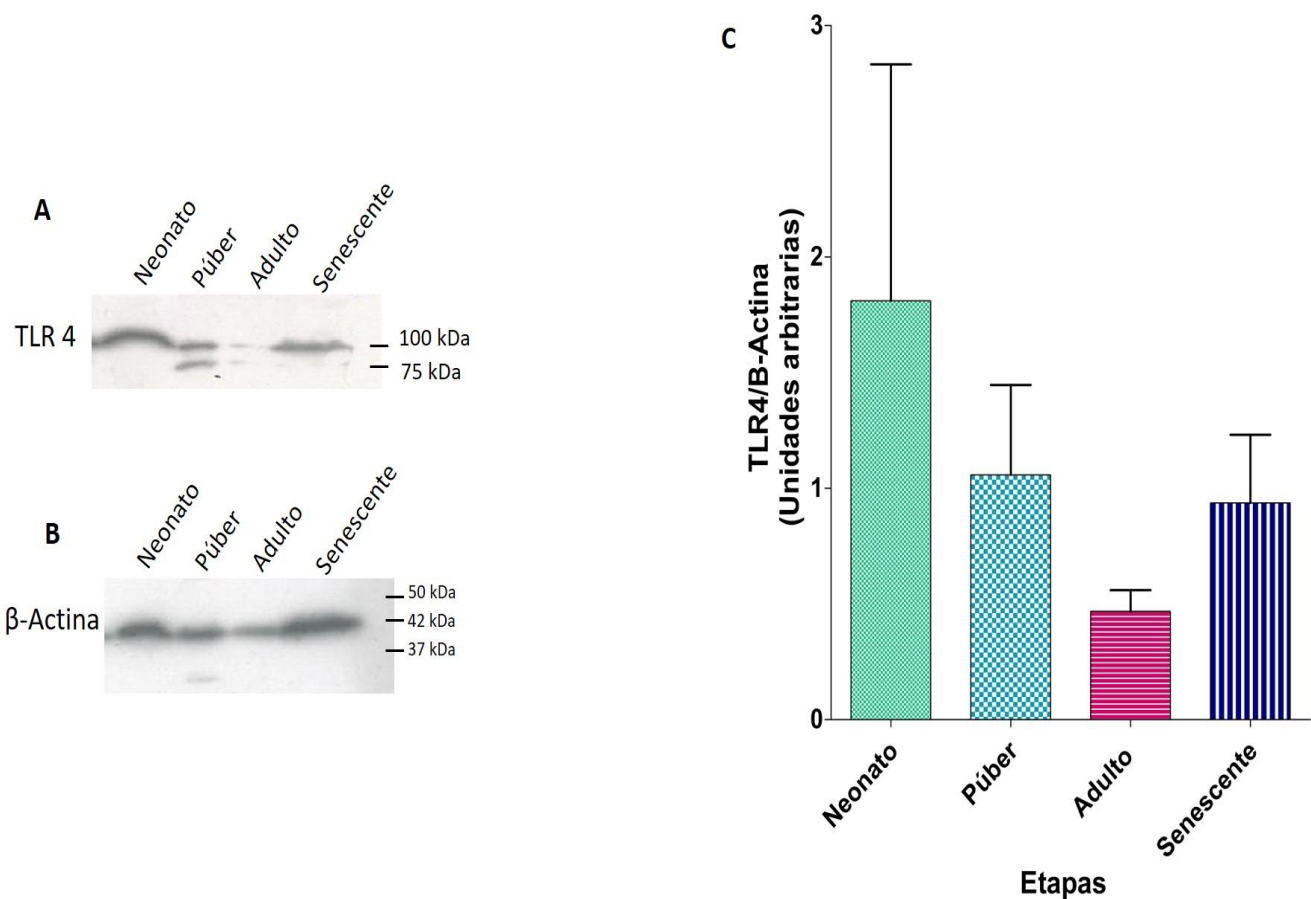


Figura 10 Proteínas totales de timocitos de cada etapa de la vida de la rata macho Wistar analizadas mediante Western Blot con el anticuerpo TLR4 (**A**) y el anticuerpo β -Actina (**B**) como control de carga. **C.** Cuantificación de la expresión de TLR4 normalizada con respecto a β -Actina. El análisis estadístico (ANOVA) no mostró diferencia significativa entre cada etapa ($p=0.2321$).

En las etapas neonatal y senescente se mostraron niveles de expresión de TLR4 aumentados en timocitos tres veces con respecto a la etapa adulta, y una vez con respecto a la etapa puberal, siendo en la adultez la expresión de la molécula casi indetectable. Cabe mencionar que en la etapa puberal se observó una isoforma de peso molecular cercana a 75 kDa además de la esperada para TLR4 (95 kDa).

Los resultados no fueron estadísticamente significativos, sin embargo existe una tendencia muy clara de cambios en la presencia de esta proteína entre cada etapa de la vida de la rata. Los senescentes presentaron mayor cantidad de tejido adiposo en el timo en comparación con los otros grupos.

9. DISCUSIÓN

Nuestros resultados mostraron la presencia de la proteína TLR4 en el timo de ratas Wistar macho en las cuatro etapas de la vida, que anteriormente no se había descrito en la literatura para el biomodelo de la rata, como se puede ver en el Cuadro 5. (adaptada de Vaure 2014). En roedores, sólo se ha demostrado TLR4 en el timo de biomodelos experimentales en ratones.

TLR4 expression across species.

Organs	Human	Non-human primate	Mouse	Rat	Swine	Rabbit	Dog
Thymus	+	ND	ND	ND	++	+/-	ND

Cuadro 5. Imagen adaptada de la tabla original de Vaure, 2014 en la que se muestran todos los órganos y especies animales; en la que no se ha descrito la presencia de TLR4 en el timo de la rata. ND, Not determined.

Una de las razones por la cual con la edad disminuye la inmunidad mediada por células, es la sustancial reducción en la fracción de linfocitos T vírgenes, con un incremento en las células T de memoria; estos procesos están asociados a la involución fisiológica del timo. El efecto de la reducción de las células T vírgenes en la periferia es la contracción del repertorio y por consiguiente, se generan respuestas pobres a nuevos antígenos. (Akbar, 2000)

Se ha demostrado una acumulación de sustancias lipotóxicas en el timo de modelos murinos que lleva a un aumento de procesos inflamatorios asociados a la atrofia de este órgano. Por lo que recientemente se ha considerado a la inmunosenescencia como una inflamación crónica fisiológica (Dixit, 2012).

Cabe mencionar que estas moléculas lipídicas forman parte de los DAMPs y son ligandos del receptor TLR4. Sin embargo, se desconoce si la expresión de TLR4 o su señalización en el timo están asociados con la edad.

En este estudio se comparó la expresión de TLR4 en el timo de la rata macho en las diferentes etapas de la vida en las que el timo tiene procesos importantes como es la etapa neonatal e infantil en donde éste órgano es el más activo y las etapas adulta y senescente en donde ya encontramos un órgano que ha involucionado. Se encontró una expresión aumentada de TLR4 en las etapas neonatal y senescente en comparación con la etapa adulta y puberal siendo la etapa adulta la de menor expresión. Estos cambios podrían explicar diferencias en el proceso de inflamación que se pudieran dar de manera fisiológica con la edad. (Dixit, 2009). Nuestros resultados sugieren que el mecanismo de envejecimiento asociado a la inflamación del timo es dependiente de la expresión de TLR4. En este sentido la mayor expresión de TLR4 en animales senescentes concuerda con una inflamación crónica asociada al envejecimiento. En concordancia con nuestros resultados, se ha observado un aumento de TLR4 en el timo involucionado de humanos (Bernasconi P, 2005).

La inmunidad innata así como la adaptativa intervienen en la inmunosenescencia, ya que los altos niveles de citocinas pro-inflamatorias en

animales de mayor edad significan un riesgo para la salud con una facilidad de desarrollar múltiples patologías. (High, 2012). Si en etapas de organismos jóvenes se encuentra un estado pro-inflamatorio resulta en una alta resistencia contra enfermedades y asegura la supervivencia del organismo, por el contrario en etapas de mayor edad se encuentra un estado inflamatorio crónico. (Coder, 2015).

El envejecimiento provoca cambios arquitectónicos en el timo, (Silva, 2008) pero las áreas funcionales residuales del tejido permanecen a lo largo de toda la vida, el organismo no logra defenderse de las enfermedades en animales de mayor edad, con respecto a cómo actuaría el sistema inmune de un animal más joven. (Connoy, 2006).

En este sentido el resultado de una menor expresión de TLR4 en la etapa adulta en comparación con la etapa senescente concuerda con lo esperado. Sin embargo, encontramos que el timo de neonatos tiene una expresión aumentada de TLR4 con respecto a la etapa adulta, en la cual esperábamos que hubiera una mayor expresión. Esto podría explicarse a que durante la etapa neonatal (Dixit, 2012) una expresión de TLR4 aumentada en el timo estaría asociada a una mayor respuesta de esta vía de señalización que podría estar involucrada tanto en procesos inflamatorios pero también en procesos de tolerancia inmunológica que ocurren durante esta etapa de la vida. Se requiere seguir caracterizando la vía de señalización de TLR4-NFkB (Salminen, 2008) en cada una de las etapas de la vida de la rata así como la presencia de la isoforma que sólo encuentra presente en la etapa puberal.

En la etapa puberal se presentó una doble isoforma de TLR4, esto puede deberse a que el TLR4 puede presentar distintos niveles de glicosilación (DaSilva, 2002). Existen reportes de niveles de glicosilación en el receptor TLR4 en donde las formas más glicosiladas pueden encontrarse cercanas a 110 kDa mientras que las desglicosiladas alrededor de 80 kDa (DaSilva Correia, 2002), por lo que las dos bandas de TLR4 que observamos en la etapa puberal pudieran ser receptores con distintos niveles de glicosilación.

10. REFERENCIAS

1. Abbas, A. K. Inmunología celular y molecular. 8ª ed. Licthan, A. H. & Pili-lai, S. Madrid: Elsevier; 2012.
2. Akbar AN, Soares MV, Plunkett FJ, Salmon M. Differential regulation of CD8+ T cell senescence in mice and men. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2000;121:69–76.
3. Akira, S. & Kawai, T. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*. 2010; 373-384.
4. Alcalá-Pérez D y cols. Inflammaging: envejecimiento inflamatorio. *Rev Cent Dermatol Pascua*. 2018; 27 (3).
5. Amiya K. Ghosh, Martin O´Brien, Theresa Mau, Raymund Yung. Toll-like receptor 4 (TLR4) deficient mice are protected from adipose tissue inflammation in aging. *Aging*. 2017; 9 (9).
6. Anis Larbi, Claudio Franceschi, Dawn Mazzatti, Rafael Solana, Anders Wikby, Graham Pawelec, *PHYSIOLOGY*. 2008; 23: 64–74.
7. Bernasconi P, y cols, Increased. Toll-Like Receptor 4 Expression in Thymus of Myasthenic Patients with Thymitis and Thymic Involution *Am J Pathol*. 2005 Jul; 167(1): 129–139
8. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leuk Biol*, 2007. 81: 1-5.
9. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
10. Bruijntjes JP, Kuper CF, Robinson JE, Schuurman HJ. Área libre de epitelio en la corteza tímica de ratas. *Dev Immunol*. 1993; 3: 113–22.
11. Caruso C, Buffa S, Cardore G, Colonna-Romano G, Dunn-Walters D, Kipling D, et al. Mechanisms of immunosenescence. *Immun Ageing* 2009; 6:10-4.
12. Coder BD, Wang H, Ruan L, Su DM, Thymic involution perturbs negative selection leading to autoreactive T cells that induce chronic inflammation. *J Immunol* 2015;194:5825-5837.

13. Connoy AC, Trader M, High KP. Age-related changes in cell surface and senescence markers in the spleen of DBA/2 mice: a flow cytometric analysis. *Experimental Gerontology*. 2006;41:225–229.
14. Cunningham J G. Klein B G. *Fisiología Veterinaria*. Ed Elsevier; 2013.
15. DaSilva Correia y cols. MD-2 and TLR4 N-linked glycosylations are important for a functional lipopolysaccharide receptor. *J Biol Chem*. 2002; 277: 1845-1854.
16. Derhovanessian, E, Maier, A.B, Beck R, Jhan G, Hahnel K, Slagboom, P. E. Hallmark features of immunosenescence are absent in familial longevity. *J Immunol*. 2010; 185 (8), 4618-4624.
17. Dixit V. Thymic Fatness and Approaches to Enhance Thymopoietic Fitness in Aging. *Curr Opin Immunol*. 2010; 4: 521–528.
18. Dixit V. Impact of immune-metabolic interactions on age-related thymic demise and T cell senescence. *Seminars in Immunology*, Elsevier 2012; 24:321-330.
19. Domínguez N, Zentella A, Rodríguez R. Control Molecular de la inflamación. Regulación de los receptores tipo toll. *REB*. 2009; 28 (4): 125-131.
20. Dyce K M, Sack W O, y Wensing C J G. *Anatomía Veterinaria*. Ed. El Manual Moderno. 2007
21. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E et al. Inflamm-aging An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 908: 244-254. doi:[10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x)
22. Funderburg N, Luciano AA, Jiang W, Rodriguez B, Sieg SF, Lederman MM. Toll-Like Receptor Ligands Induce Human T Cell Activation and Death, a Model for HIV Pathogenesis. *PLoS One*. 2008 Apr 2;3(4):e1915. doi: 10.1371/journal.pone.0001915.
23. García B, Lage A. Inmunosenescencia: implicaciones para la inmunoterapia de cáncer en los adultos mayores. *Biotechnología Aplicada*. 2006;23:186-93.

24. Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing. *J Pathol.* 2007; 211:144-56.
25. Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spöttl T, Andus T, Schölmerich J, Herfarth H, Ray K, Falk W, Rogler G. Toll – like receptors 2 and 4 are up - regulated during intestinal inflammation, *Gastroenterology*, 2002.; 7:1987-2000.
26. High KP, AN Akbar, J Nikolich-Zugich, Translational research in immune senescence: assessing the relevance of current models, *Seminars in immunology*, Elsevier, 2012. doi: [10.1016/j.smim.2012.04.007](https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.04.007)
27. Jacobs MT, Frush DP, Donnetty LF. The right place at the wrong time: historical perspective of the thymus gland and pediatric radiology. *Radiology.* 1999;210:11-6.
28. Jin B, Sun T, Yu X, Y, Yeo A. The effects of TLR Activation on T-cell development and differentiation. *Clinical and Developmental Immunology.*2012. 2012; ID 836485.
29. Jose SS, Bendickova K, Kepak T, Kreniva Z and Fric J. Chronic inflammation in immune aging: role of pattern recognition receptor crosstalk with the telomere complex, *Frontiers Immunol*, 2017. 8:1078.
30. Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*, 5, 461.
31. Lee. K M. Seong S Y. Partial role of TLR4 as a receptor responding to damage associated molecular pattern. *Immunological Letters.* 2009; 125:31-39.
32. Lepletier A, Savino W, Guaraldi F. Inflammation and Thymus Aging. *Endocrine Immunology*, *Front Horm Res.* Basel, Karger, 2017, Vol 48, pp 19-36
33. Lizundia R, Sauter KS, Taylor G, Werling D. Host species-specific usage of the TLR4-LPS receptor complex.. *Innate Immun* (2008) 14 :223–3110.1177/ 1753425908095957
34. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008; 42, (2): 145-151.
35. Lynch, HE, Goldberg, GL, Chidgey, A., Van den Brink, MR, Boyd, R. y Sempowski, GD (2009). Involución tímica y reconstitución

immune. *Immunology Trends*, 30 (7), 366–373. doi: 10.1016 / [j.it.2009.04.003](https://doi.org/10.1016/j.it.2009.04.003)

36. Ma C, Pi C, Yang Y, Lin L, Shi Y, Li Y, He X. NAMPT expression decreases age related senescence in rat bone marrow mesenchymal stem cells by targeting Sirt 1, *PLoS One*, 2017.
37. Makinodan, T, Nature of the decline in antigen-induced humoral immunity with age. *Mech. Ageing Dev.* 1980. 14 (1-2), 165-172.
38. O’Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immune.* 2007; 7(5):353-364
39. Palmer DB. The effect of age on thymic function. *Front Immunol.* 2013; 4:316
40. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature.* 2009;458(7242):1191-1195.
41. Pasare C, Medzhitov R (2005) Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* 560: 11–8.
42. Pearce, G. Normal Structure, Function and Histology of the Thymus. *Toxicologic Pathology*, 2006; 34(5), 504–514.
43. Rezzani R, Nardo L, Favero G, Peroni M, Rodella L. Thymus and aging: morphological, radiological and functional overview. *Age.* 2014; 36: 313-351.
44. Salminen A, Suuronen T, Huuskonen J, Kaarniranta K. NEMO shuttle: a link between DNA damage and NF kappaB activation in progeroid syndromes? *Biochem Biophys Res Commun*, 2008: 367: 715(8).
45. Sauce D, Appay V. Altered thymic activity in early life: how does it affect the immune system in young adults? *Curr Opin Immunol.* 2011; 23(4):543-8.
46. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating its age with human’s. *International Journal of Preventive Medicine* 2013; 6:624-630.
47. Silva Aw D, Maddick M, Architectural changes in the thymus of aging mice, *Aging Cell*, 2008: 7 (2); 158-67.

48. Shanley DP, Aw D, Manley NR, Palmer DB. An evolutionary perspective on the mechanisms of immunosenescence. *Trends Immunol*, 2009; 30:374-381.
49. Tizard I R. *Introducción a la Inmunología Veterinaria*, Ed. Elsevier. 2009; 10:112-116.
50. Vaure C y Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Frontiers Immunol*, 2014; 5:1-15.
51. X.J. Li, B. Li^{1*}, J.S. Huang, J.M. Shi¹, W. Fan¹ and Y.L. Zhou, The Quantitative Alteration of TLR4 in Rat Spleen after Exposure to Acrylonitrile and Subsequent Detoxification by Sodium Thiosulfate, Department of Occupational Health, ¹Central Laboratory, Jinshan Hospital, 2016. doi: 10.4172/pharmaceutical-sciences.1000157.

ANEXOS

Anexo1.Preparación de soluciones

PBS 10X (1 L)

PBS 1X (500 mL)

Buffer de lisis de eritrocitos (500 mL)

Laemmli 5X (10 mL)

Solución de lisis A (citoplasma y membrana)

Anexo 2. Preparación de soluciones para muestras

DTT 1M (5 mL)

Laemmli 5X (10 mL)

Anexo 3. Preparación de soluciones para electroforesis y transferencia

Buffer de electroforesis 10X (1L)

Buffer de electroforesis 1X (1L)

Buffer de transferencia 10X (1L)

Buffer de transferencia 1X (1L)

TBS 10X pH 7,6 (1 L)

TBS-Tween (TBS-T) 500 mL

Anexo 4. Preparación de soluciones, anticuerpo primario

Azida de sodio 10% (100 mL)

Preparación de soluciones

Buffer de electroforesis 10X (1L)

Cuadro 1. Componentes y cantidades para la preparación de 1L de Buffer de electroforesis 10X.

Componente	Cantidad
Tris (0.5M)	30 g
Glicina (1.92 M)	144 g
SDS 20 % (1%)	50 mL

Disolver los componentes en 800 mL de H₂O miliQ en un agitador magnético, traspasar a probeta de 1L y aforar con H₂O miliQ a 1L; colocar la solución en frasco de vidrio y etiquetarlo.

Buffer de electroforesis 1X (1L)

Agregar 100 mL de buffer de electroforesis 10X y aforar con 900 mL de H₂O miliQ en una probeta de 1L, agitar solución y transferir a frasco de 1L, etiquetado.

Buffer de transferencia 10X (1L)

Cuadro 2. Componentes y cantidades para la preparación de 1L de Buffer de transferencia 10X.

Componente	Cantidad
Tris (0.5M)	30 g
Glicina (1.92 M)	144 g

Disolver los componentes en 800 mL de H₂O miliQ en un agitador magnético, traspasar a probeta de 1L y aforar con H₂O miliQ a 1L; colocar la solución en frasco de vidrio y etiquetarlo.

Buffer de transferencia 1X (1L)

Agregar 100 mL de buffer de transferencia 10X, agregar 200 mL de etanol absoluto y aforar con 700 mL de H₂O miliQ en una probeta de 1L, agitar solución y transferir a frasco de 1L, etiquetado. Refrigerar.

TBS 10X pH 7,6 (1 L)

Cuadro 3. Componentes y cantidades para la preparación de 1L de TBS 10X pH 7,6.

Componente	Cantidad
Tris (0.2M)	24.2 g
NaCl (1.37 M)	80 g

Disolver los componentes en 700 mL de H₂O miliQ en un agitador magnético, ajustar a pH 7,6 con HCl, traspasar a probeta de 1L y aforar con H₂O miliQ a 1L; colocar la solución en frasco de vidrio y etiquetarlo. Refrigerar.

TBS-Tween (TBS-T) 500 mL

Agregar 50 mL de TBS 10X, aforar con 450 mL de H₂O miliQ en una probeta de 500 mL, traspasar a un frasco de vidrio y agregar 0.5 mL de Tween 20, mezclar, etiquetar. Refrigerar.

PBS 10X (1 L)

Cuadro 4. Componentes y cantidades para la preparación de 1L de PBS 10X.

Componente	Cantidad
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14.4 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g

Disolver los componentes en 800 mL de H₂O miliQ en un agitador magnético, traspasar a probeta de 1L y aforar con H₂O miliQ a 1L; colocar la solución en frasco de vidrio y etiquetarlo. Refrigerar.

PBS 1X (500 mL)

Agregar 50 mL de PBS 10X y aforar con 450 mL de H₂O miliQ en una probeta de 500 mL, agitar solución y transferir a frasco de 500 mL, etiquetado. Refrigerar.

DTT 1M (5 mL)

Disolver en 5 mL de H₂O miliQ, 0.771 g de DTT; traspasar a tubos Eppendorf en alícuotas de 500 µL. Etiquetar y congelar.

Laemmli 5X (10 mL)

Cuadro 5. Componentes y cantidades para la preparación de 10 mL de Laemmli 5X.

Componente	Cantidad
Tris-HCl pH 6.8 1M (164.5 mM)	1.645 mL
Glicerol (55.5 %)	5.55 mL
SDS (5.25 %)	525 mg
Azul de bromofenol (0.025 %)	2.5 mg

Disolver el SDS en 2.5 mL de H₂O miliQ, agregar los demás componentes y seguir mezclando en agitador magnético, traspasar a tubo Falcon de 15 mL y llevar a 10 mL con H₂O miliQ y etiquetarlo.

Azida de sodio 10% (100 mL)

Disolver en 100 mL de H₂O miliQ, 10 g de azida de sodio. Para el manejo de este reactivo, utilizar guantes, lentes de seguridad, cubrebocas y bata. Transferir a frasco de 200 mL, etiquetado. Refrigerar.

Buffer de lisis de eritrocitos (500 mL)

Cuadro 6. Componentes y cantidades para la preparación de 500 mL de Buffer de lisis de eritrocitos.

Componente	Concentración	Cantidad
NH ₄ Cl	155 mM	4.1 g
KHCO ₃ 10	10 mM	0.5 g
EDTA	0.1 mM	0.015 g

Solución de lisis

Cuadro 7. Componentes y cantidades para la preparación de 1mL de solución de lisis.

Componente	Cantidad
Tris HCl pH 7.6	100 µL
Na Cl 1M	100 µL
NP 40% 1%	10 µL

EDTA 0.5 M	10 μ L
Inhibidor de proteasas	40 μ L
Na ₃ VO ₄ 2mM	10 μ L
NaF 1M	50 μ L
H ₂ O Mili Q	680 μ L

Cuadro 8. Componentes y cantidades para la preparación de 3mL de solución de lisis.

Componente	Concentración M	Cantidad
Tris HCl pH 7.6	20mM	300 μ L
Na Cl	1M	300 μ L
NP 40% 1%	30 μ L	30 μ L
EDTA	0.5 M	30 μ L
Inhibidor de proteasas 25X Roche	120 μ L	120 μ L
Na ₃ VO ₄ 2mM	2 mM	30 μ L
NaF	1 M	150 μ L
H ₂ O Mili Q	2040 μ L	2040 μ L