



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

Unidad Coapa

Departamento de Farmacobiología

**Caracterización de las posibles vías de señalización
intracelular activadas por LPS en células cebadas**

Tesis que presenta:

Abraham Román Figueroa

Para Obtener el Grado de Maestro en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directora de tesis:

Dra. Claudia González Espinosa

Ciudad de México

Agosto, 2017

Esta tesis se realizó en el laboratorio 11 del departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la dirección de la **Dra. Claudia González Espinosa**.

Este trabajo se pudo realizar gracias al apoyo de beca de maestría **No. 425874** otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**)

A mi abuelita Martha y a mi tía Licha por su amor incondicional

Agradecimientos

A mi directora de tesis, la Dra. Claudia González Espinosa por contagiarme de su entusiasmo y pasión por la ciencia. Además de guiarme durante el desarrollo de este proyecto de investigación, con una increíble paciencia y generosidad.

A los integrantes de mi sínodo: Dra. Gabriela Rodríguez Manzo y Dra. Erika Rendón Huerta por sus acertadas aportaciones y sugerencias que permitieron la mejora y el enriquecimiento de mi proyecto de investigación

Al M. en C. Alfredo Sánchez Ibarra, por sus invaluable enseñanzas durante mi estancia en el laboratorio. Además del apoyo en la realización de algunos experimentos.

A Fany, por su cariño y apoyo incondicional durante el desarrollo de este proyecto y por contribuir a hacer del cinvestav un segundo hogar para mí.

A mis compañeros de laboratorio: Itzel, Marian, Pablo, Jorge, Deysi, Jonathan, Zyanya, Fabiola, Karlita y Rodolfo por los increíbles momentos compartidos durante mi estancia en el laboratorio.

A mis amigos de la maestría: Yarim, Isabel, Aby, Pablo y Mariana por brindarme su invaluable amistad, apoyo y lealtad incondicional.

A mis padres y a mi hermana Karla por su amor y apoyo incondicional

INDICE

I. ÍNDICE DE FIGURAS	III
I. LISTA DE ABREVIATURAS	V
II. RESUMEN	VIII
III. ABSTRACT	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Las células cebadas (CC)	1
1.2. Generalidades de las CC	1
1.3. Las CC en la inmunidad innata	2
1.4. Receptores de la inmunidad innata y adaptativa expresados por las CC	3
1.4.1. Receptores de reconocimiento de patrones expresados por las células cebadas	3
1.4.2. Receptor de alta afinidad por la fracción constante de la inmunoglobulina E	5
1.5. Receptor tipo Toll 4	7
1.5.1. Moléculas accesorias del TLR4	8
1.5.2. Sistema de reconocimiento del LPS	9
1.5.3. Sistema de señalización del TLR4	9
1.5.4. Vía dependiente de MyD88	10
1.5.5. Vía dependiente de TRIF	11
1.5.6. Tráfico vesicular del TLR4	13
1.6. CD14 regula la activación de la vía dependiente de MyD88 y de la vía dependiente de TRIF del TLR4	15
1.7. El rol de las CC como reguladores de las respuestas inflamatorias en modelos “in vivo	17
2. ANTECEDENTES	18
3. JUSTIFICACIÓN	21

4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVO GENERAL	21
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
7. MATERIALES Y MÉTODOS	23
7.1 Obtención y cultivo de CC de origen murino	23
7.2 Sensibilización con IgE	23
7.3 Estimulación del receptor TLR4	23
7.4. Pre-incubación con dynasore	24
7.5 Determinación de proteínas fosforiladas en extractos totales (western blot)	24
7.6 Inmunofluorescencia	25
7.7 Análisis Estadístico	26
8 RESULTADOS	27
9 DISCUSIÓN	36
10 RESUMEN DE RESULTADOS	41
11 CONCLUSIONES	42
12 PERSPECTIVAS	43
13 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

I. INDICE DE FIGURAS

Número	TÍTULO DE LA FIGURA	Página
Figura 1	Microfotografía electrónica de una célula cebada	1
Figura 2	Receptores de reconocimiento de patrones expresados por las CC	3
Figura 3	Estructura del lipopolisacárido bacteriano	4
Figura 4	Receptor FcεRI	7
Figura 5	Estructura del complejo TLR4-MD2	8
Figura 6	Sistema de señalización del TLR4	12
Figura 7	Tráfico vesicular del TLR4	14
Figura 8	El co-receptor CD14 favorece la activación de la vía dependiente de MyD88 del TLR4	15
Figura 9	El co-receptor CD14 induce la internalización del TLR4 y la producción de IFN tipo 1 en macrófagos	16
Figura 10	La IL-10 producida por las CC residentes del epitelio vesical limita el aclaramiento bacteriano	17
Figura 11	Ausencia de la vía endosómica de señalización del TLR4 en BMMCs	18
Figura 12	La sensibilización de las BMMCs con IgE monomérica induce un aumento en la expresión del RNA mensajero de los co-receptores CD14 y MD2.	19

Figura 13	Inmunoreactividad intracelular del TLR4 y de CD14	19
Figura 14	La estimulación con LPS induce la expresión de IL-10 en BMMCs	20
Figura 15	Curso temporal de la fosforilación de NF- κ B.	27
Figura 16	Curso temporal de la fosforilación de p38- α/β	28
Figura 17	Curso temporal de la fosforilación de ERK 1/2	29
Figura 18	Efecto del dynasore sobre la fosforilación de NF- κ B inducida por LPS	30
Figura 19	Efecto del dynasore sobre la fosforilación de p38 α/β inducida por LPS	31
Figura 20	Efecto del dynasore sobre la fosforilación de ERK 1/2 inducida por LPS	32
Figura 21	Determinación de la translocación perinuclear de CD14 y su sensibilidad a dynasore	33
Figura 22	Determinación de la translocación perinuclear del TLR4 y su sensibilidad a dynasore	34
Figura 23	El TLR4 y CD14 co-localizan en la región perinuclear en respuesta al LPS	35
Figura 24	La endocitosis del TLR4 y de CD14 es necesaria para poder activar a la MAPK ERK 1/2	40

II. LISTA DE ABREVIATURAS

ARF6	Factor 6 de ADP ribosilación
Bcl-10	Proteína del linfoma/leucemia de células B-10
BMMCs	Células cebadas derivadas de médula ósea
BTK	Tirosina quinasa de Bruton
CC	Células cebadas
CD14	Clúster de diferenciación 14
CD25	Clúster de diferenciación 25
DAG	Diacilglicerol
DAMPs	Patrones moleculares Asociados a Daño
DD	Dominio de muerte
Dominio IG	Dominio de inmunoglobulina
Dominio SH2	Dominio de homología con SRC 2
Dominio TIR	Dominio de homología entre el receptor tipo toll y el receptor de IL-1
EICH	Enfermedad de Injerto contra el Huésped
ERK 1/2	Cinasa regulada por señales extracelulares
FcεRI	Receptor de alta afinidad por la fracción constante de la IgE
Foxp3	Factor de transcripción con una caja de horquilla P3
Gp96	Glicoproteína 96
Hrs	Substrato de la tirosin cinasa regulada por el factor de crecimiento de hepatocito
IFN I	Interferón tipo 1
IFN II	Interferón tipo 2
IgE	Inmunoglobulina E
IKK α	Cinasa del Inhibidor del factor nuclear kappa B α
IKK β	Cinasa del Inhibidor del factor nuclear kappa B β
IKK γ	Cinasa del Inhibidor del factor nuclear kappa γ
IKKε	Cinasa del Inhibidor del factor nuclear kappa B ε
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10

IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-2	Interleucina-2
IL-3	Interleucina-3
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IP3	Inositol 3 fosfato
IRAK 1	Cinasa asociada al receptor de IL-1
IRAK 2	Cinasa asociada al receptor de IL-1
IRAK 4	Cinasa asociada al receptor de IL-1
IRF3	Factor Regulador de Interferón 3
ITAM	Motivos de activación del inmunoreceptor basados en tirosina
I κ B	Inhibidor del factor nuclear κ B
JNK	Cinasa del extremo N-terminal de c-JUN
LAT	Proteína de enlace para la activación de células T
LBP	Proteína de unión al LPS
LPS Bacteriano	Lipopolisacárido Bacteriano
LRRs	Secuencias Repetidas ricas en leucina
MAP3K	Cinasa de la cinasa de la cinasa activada por mitogenos
MAPK	Proteína cinasa activada por mitogenos
MD-2	Proteína de diferenciación mieloide 2
MyD88	Factor de diferenciación mieloide 88
NF- κ b	Factor Nuclear κ b
NLRs	Receptores tipo NOD
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PI5K	Fosfatidilinositol 5-cinasa
PIP2	Fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato
PKB	Proteína Cinasa B
PLC	Fosfolipasa C
PLC- γ 2	Fosfolipasa C γ 2
PRAT4A	Proteína Asociada al TLR4
p-SYK	Tirosina Cinasa de Bazo
Rab7a	Proteína relacionada con Ras 7a
RER	Retículo Endoplásmico Rugoso
RLRs	Receptores tipo RIG
RRP	Receptores de reconocimiento de patrones
SARM	Motivo que contiene a TIR estéril alfa 1

SMOC	Centro de Organización Supramolecular
TAB1/2	Proteína de unión a TAK1
TAK1	Cinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante β
TBK1	Cinasa 1 de unión a TANK
TIRAP	Proteína adaptadora que contiene al dominio TIR
TLR1	Receptor Tipo Toll 1
TLR2	Receptor Tipo Toll 2
TLR3	Receptor Tipo Toll 3
TLR4	Receptor Tipo Toll 4
TLR5	Receptor Tipo Toll 5
TLR6	Receptor Tipo Toll 6
TLR7	Receptor Tipo Toll 7
TLR9	Receptor Tipo Toll 9
TLRs	Receptores Tipo Toll
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TPL2	Locus 2 de progresión de tumor
TRAF3	Factor 3 asociado al receptor de TNF
TRAF6	Factor 6 asociado al receptor de TNF
TRAM	Molécula adaptadora relacionada a TRIF
TRIF	Proteína adaptadora inductora de IFN β que contiene al dominio TIR
WT	Silvestre

III. RESUMEN

Introducción: Las células cebadas (CC) desempeñan una función importante en la inmunidad innata debido a que expresan diversos receptores de reconocimiento de patrones, entre los cuales se encuentran los receptores tipo Toll (TLRs). Estos les confieren la capacidad de montar respuestas inflamatorias contra una amplia variedad de patógenos. En macrófagos y células dendríticas el TLR4 localizado en la membrana plasmática, reconoce con alta selectividad al LPS bacteriano y activa una vía de señalización dependiente del adaptador MyD88 induciendo la producción de citocinas pro-inflamatorias. Después de su estimulación, en presencia de CD14 y mediante la actividad de la dinamina el TLR4 es internalizado y transportado hacia endosomas tempranos. En estas estructuras se activa la vía dependiente de TRIF, que conduce a la producción de citocinas reguladoras. El sistema de señalización intracelular del receptor TLR4 no se ha caracterizado en células secretoras del sistema inmune (como las CC). **Objetivo:** Recolectar evidencia de la existencia de posibles vías de señalización intracelular activadas por LPS en CC. **Materiales y métodos:** En todos los experimentos las CC derivadas de medula ósea (BMMCs) provenientes de ratones C57BL/6J fueron sensibilizadas con IgE. Posteriormente fueron preincubadas con dynasore o medio de cultivo y a continuación fueron estimuladas con LPS. Se analizó la fosforilación del NF- κ B y de las MAP cinasas p38 α/β y ERK 1/2 mediante Western Blot. Además, se analizó la localización del TLR4 y del co-receptor CD14 en condiciones basales o en respuesta al LPS. **Resultados:** La activación del TLR4 por LPS induce una fase temprana (0-30 minutos) y otra tardía (1-2 horas) de fosforilación del NF- κ B y de las MAP cinasas p38 y ERK 1/2. La preincubación con dynasore inhibió la fosforilación de la MAP cinasa ERK 1/2 inducida por LPS, sin modificar la fosforilación del NF- κ B y de la MAP cinasa p38. Por otra parte, la estimulación con LPS indujo la translocación perinuclear del TLR4 y de CD14, la cual fue inhibida por la preincubación con dynasore. **Conclusión:** Se encontró evidencia de que en BMMCs que expresan CD14, la estimulación con LPS activa la vía dependiente de MyD88 induciendo la fosforilación del NF- κ B y de la MAP cinasa p38. Además mediante la actividad de la

dinamina el TLR4 y el co-receptor CD14 se movilizan hacia la región perinuclear y este fenómeno está relacionado con la fosforilación de la MAPK ERK 1/2

IV. ABSTRACT

Introduction: Mast cells (MCs) play an important role in innate immunity because they express a wide variety of pattern recognition receptors, including toll-like receptors (TLRs), which confers the ability to evoke inflammatory responses toward a wide variety of pathogens. In macrophages and dendritic cells TLR4 located in the plasmatic membrane, recognizes with high selectivity the bacterial LPS and triggers the activation of a MyD88-dependent signaling pathway which leads to the production of pro-inflammatory cytokines. Then after their stimulation, in presence of CD14 and through the activity of the dynamin, TLR4 receptor is internalized and transported to early endosomes. In this structures the TRIF-dependent signaling pathway is activated, which leads to the production of regulatory cytokines. The intracellular signaling system of TLR4 receptor has not been characterized in secretory cells of the immune system (like MCs). **Objective:** Obtain evidence of the existence of possible intracellular signaling pathways activated by LPS in MCs. **Materials and methods:** In all experiments Bone marrow-derived Mast Cells (BMMCs) from C57BL/ 6J mice were sensitized with IgE. Then were preincubated with dynasore or with culture medium and next were stimulated with LPS. We analyzed the phosphorylation of the NF- κ B and the MAP kinases p38 α / β and ERK 1 / 2 using Western Blot analysis. Also, we analyzed the localization of TLR4 receptor and CD-14 co-receptor in basal condition or in response to LPS. **Results:** Activation of TLR4 by LPS induces both early (0-30 minutes) and late phase (1-2 hours) of phosphorylation of NF- κ B and MAP kinases p38 and ERK 1 / 2. Preincubation with dynasore disrupted phosphorylation of LPS-induced MAP kinase ERK 1/2, without modify phosphorylation of NF- κ B and p38 MAP kinase. On the other hand, stimulation with LPS induced perinuclear translocation of TLR4 receptor and CD14 co-receptor, which was disrupted by preincubation with dynasore. **Conclusion:** We found evidence that in BMMCs that express CD14, stimulation with LPS trigger the MyD88-dependent signaling pathway that leads to phosphorylation of the NF- κ B and MAP kinase p38. Subsequently by the activity of the dynamin, TLR4 receptor and

CD14 co-receptor were mobilized towards the perinuclear region and this phenomena is related with the phosphorylation of MAP kinase ERK 1/2

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Las células cebadas (CC)

Las células cebadas o mastocitos son células granuladas del sistema inmune innato y se encuentran en todos los tejidos vascularizados del cuerpo (Figura 1) (John & Abraham, 2013). Se derivan de precursores que se generan en la médula ósea gracias a la interleucina (IL)-3 y al stem cell factor (SCF). Esos precursores salen de la médula ósea todavía inmaduros y se instalan en todos los tejidos, donde terminan su diferenciación bajo la influencia de mediadores producidos localmente (Da Silva et al., 2014). Esto ocasiona que los receptores expresados en las CC y las vías de señalización que llevan a la producción de mediadores inflamatorios varíen entre poblaciones residentes en distintos tejidos (Gurish, MF y Austen, K.F., 2012)

1.2 Generalidades de las CC

Las CC producen y almacenan diversos tipos de mediadores, entre los cuales se encuentran sustancias preformadas (aminas biogénicas, enzimas lisosomales, proteasas, proteoglicanos, etc.), mediadores sintetizados rápidamente por la acción de enzimas membranales (metabolitos derivados del ácido araquidónico como prostaglandinas y leucotrienos) y sintetizados después de la transcripción genética, entre los cuales se encuentran diversas citocinas y quimiocinas (IL-6, IL-1, IL-8, IL-12, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, TNF, IFN tipo I y II, etc.) (Da Silva et al., 2014).

Las CC pueden ser estimuladas por diversos ligandos, entre los que se encuentran hormonas, neurotransmisores, anticuerpos, factores de crecimiento y productos bacterianos y virales. La activación de receptores específicos en este tipo celular lleva a la secreción diferencial de mediadores que actúan sobre los vasos sanguíneos, terminales nerviosas, y linfocitos, activando o inhibiendo procesos inflamatorios agudos y crónicos, diferenciación celular, cicatrización y angiogénesis, entre otros eventos (Cardamone et al., 2016).

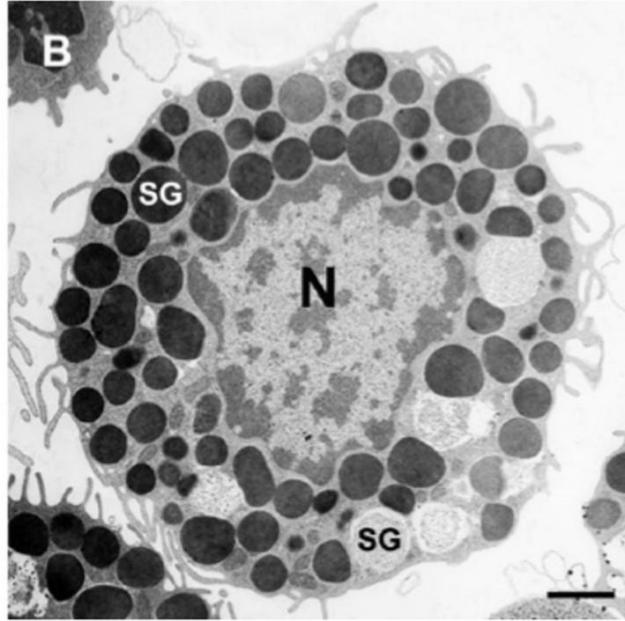


Figura 1. Célula cebada. Microscopía electrónica de transmisión que muestra una célula cebada derivada de peritoneo repleta de gránulos secretorios electrodensos. BARRA = 1 μ m. Tomado de Da Silva et al., 2014.

1.3 Las células cebadas en la inmunidad innata

Las CC desempeñan un rol importante en la protección del huésped frente a diversos microorganismos, debido a que se encuentran localizadas en tejidos de interfase entre el medio externo y el huésped (por ejemplo, en la piel, el epitelio respiratorio, el tracto gastrointestinal, etc.) alrededor de los vasos sanguíneos y, además, son abundantes en los órganos linfoides primarios y secundarios (Da Silva et al., 2014).

Dicha localización les confiere la capacidad de responder de forma inmediata ante diversos retos bacterianos y virales, liberando una batería específica de mediadores contenidos en sus gránulos, los cuales contribuyen de forma importante al inicio, desarrollo y resolución de las respuestas inflamatorias (John & Abraham, 2003).

1.4 Receptores de la inmunidad innata y adaptativa expresados por las células cebadas

1.4.1 Receptores de reconocimiento de patrones expresados por las CC

Las CC expresan una amplia variedad de receptores de reconocimiento de patrones (Figura 2) entre los cuales se encuentran los receptores tipo Toll (TLRs), los receptores intracelulares tipo NOD (NLRs) y las helicasas RIG-I, los cuales en conjunto reconocen diversos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y a daño (DAMPs), confiriéndole a las CC la capacidad de activar programas transcripcionales específicos en respuesta a una amplia variedad de microorganismos. (Tancowny et al., 2010; McCurdy et al., 2003; Kulka et al., 2004; Feng et al., 2007; Kawai & Akira, 2011)

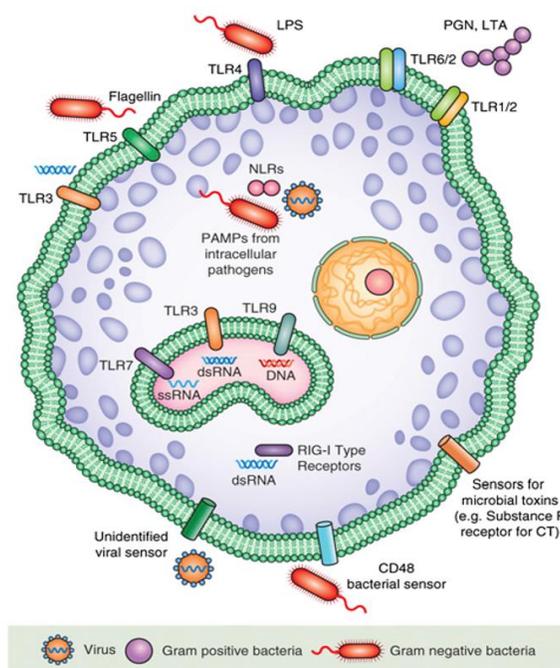


Figura 2. Receptores de reconocimiento de patrón expresados por las CC. Las CC expresan diversos RRP entre los cuales se encuentran los receptores tipo NOD (NLRs), las helicasas RIG-I y los receptores tipo Toll (TLRs). Entre los TLRs expresados por las CC se encuentran los de localización membranaral TLR1, TLR2, TLR6, TLR5 y TLR4, así como los de localización endosomal TLR3, TLR7 y TLR9. Modificado de John & Abraham, 2013.

Los TLRs expresados por las CC (Tabla 1) se encuentran localizados tanto en la membrana plasmática como en endosomas tempranos. Los de localización membranal comprenden al TLR1, TLR2 y TLR6 y reconocen lipopéptidos bacterianos, además del TLR5 que reconoce a la flagelina bacteriana.

Los receptores localizados en endosomas tempranos son el TLR3 que reconoce RNA de doble cadena viral, además del TLR7 y el TLR9, los cuales se activan en respuesta a RNA viral de cadena única y DNA genómico respectivamente. (Kulka et al., 2004)

Cabe resaltar que las CC expresan al TLR4 en la membrana plasmática, así como en endosomas tempranos. Desde ambas localizaciones el TLR4 reconoce con alta especificidad al lipopolisacárido bacteriano (LPS), también llamado endotoxina (figura 4), que es una molécula de naturaleza glicolípídica contenida en la membrana externa de las bacterias Gram negativas.

El LPS se encuentra conformado por un lípido A, un núcleo de oligosacáridos y un antígeno O altamente variable. (Raetz & Whitfield, 2002). El lípido A es el componente responsable de la alta inmunogenicidad del LPS (Galanos et al., 1985) y desempeña un papel importante en la fisiopatología del choque séptico (Cohen, 2002). Múltiples evidencias indican que la longitud, el número y el estado de fosforilación de las cadenas de ácidos grasos contenidas en el lípido A determinan las actividades inmunoestimuladoras del LPS (Mata-Haro et al., 2007; Hajjar et al., 2002; Kusumoto et al., 2003; Schromm et al., 1998, 2000)

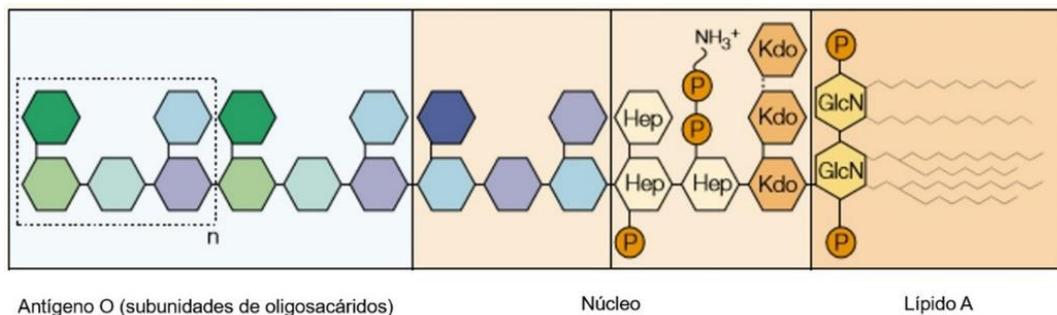


Figura 3. Estructura del lipopolisacárido bacteriano. El lipopolisacárido bacteriano está conformado por un lípido A, un núcleo de polisacáridos y un antígeno O altamente variable. Modificado de Beutler & Rietschel., 2003.

Receptor	Ligando (PAMP)	Localización	Adaptador (es) utilizado en la transducción de la señal
TLR1-TLR2 (Heterodimero)	Triacil lipopéptidos	Membrana plasmática	MyD88
TLR6-TLR2 (Heterodimero)	Diacil lipopéptidos	Membrana plasmática	MyD88
TLR3	RNA viral de doble cadena	Endosomas tempranos	TRIF
TLR4	Lipopolisacárido bacteriano	Membrana plasmática	MyD88 y TRIF
TLR5	Flagelina bacteriana	Membrana plasmática	MyD88
TLR7	RNA de cadena única	Endosomas tempranos	MyD88
TLR9	DNA viral y bacteriano	Endosomas tempranos	MyD88

Tabla 1. Receptores tipo Toll expresados por las células cebadas

1.4.2 Receptor de alta afinidad por la fracción constante de la IgE (FcεRI)

Las CC, al igual que los basófilos, expresan la isoforma tetramérica del receptor de alta afinidad para la fracción constante de la inmunoglobulina E (FcεRI), estructuralmente conformado por las subunidades α, β y 2γ (αβ2γ)

La subunidad α del FcεRI contiene 2 dominios IG asimétricos mediante los cuales el receptor establece interacciones de alta afinidad con la fracción constante de la inmunoglobulina E (IgE). La subunidad β contiene secuencias ITAM intracelulares por medio de las cuales el receptor recluta cinasas que contengan dominios SH2. Sin embargo, la principal función de la subunidad β consiste en

mediar el ensamblaje del FcεRI en la membrana plasmática. Las subunidades γ (2γ) se encuentran unidas por un puente disulfuro y, al igual que la subunidad β, contienen secuencias ITAM intracelulares mediante las cuales reclutan a proteínas adaptadoras que contengan dominios SH2 como son FYN y LYN (quinasas pertenecientes a la familia SRC) (Kraft & Kinet., 2007).

El reconocimiento de un antígeno por la IgE unida al FcεRI, conduce al entrecruzamiento del receptor, lo que permite la fosforilación de residuos de tirosina contenidos en los motivos ITAM de las cadenas β y γ intracelulares. Posteriormente, las cadenas β y γ reclutan y activan a las cinasas LYN, FYN y SYK respectivamente. A su vez, SYK fosforila a diversas proteínas adaptadoras que contienen secuencias ITAM y que se encuentran localizadas en la vecindad del FcεRI, como LAT. LAT recluta a la cinasa BTK, quien dirige la activación de la PLC, aumentando los niveles intracelulares de DAG e IP3, que regulan la movilización intracelular de calcio, orquestando diversos fenómenos celulares y bioquímicos como son la degranulación inmediata de los mediadores preformados, la síntesis de mediadores lipídicos (fase temprana) y la producción de citocinas pro-inflamatorias (fase tardía) (de Miranda et al, 2016).

Desde hace tiempo se sabe que los individuos atópicos (que producen niveles elevados de IgE) poseen CC, basófilos y monocitos que tienen altos niveles de ocupación del receptor de alta afinidad para la IgE (FcεRI). Estos individuos presentan cuadros de hipersensibilidad tipo I (Malveaux et al., 1978, Maurer et al., 1994, Sihra et al., 1997). Aunque las vías de señalización que se activan con la IgE monomérica en las CC no han sido dilucidadas en su totalidad, se sabe que la presencia de este anticuerpo (en ausencia de antígeno), puede incrementar la supervivencia y la capacidad secretora de las CC *in vitro* (Kalesnikoff et al, 2001). La descripción del receptor FcεRI y su sistema de señalización en las CC las ha colocado como responsables de las respuestas alérgicas.

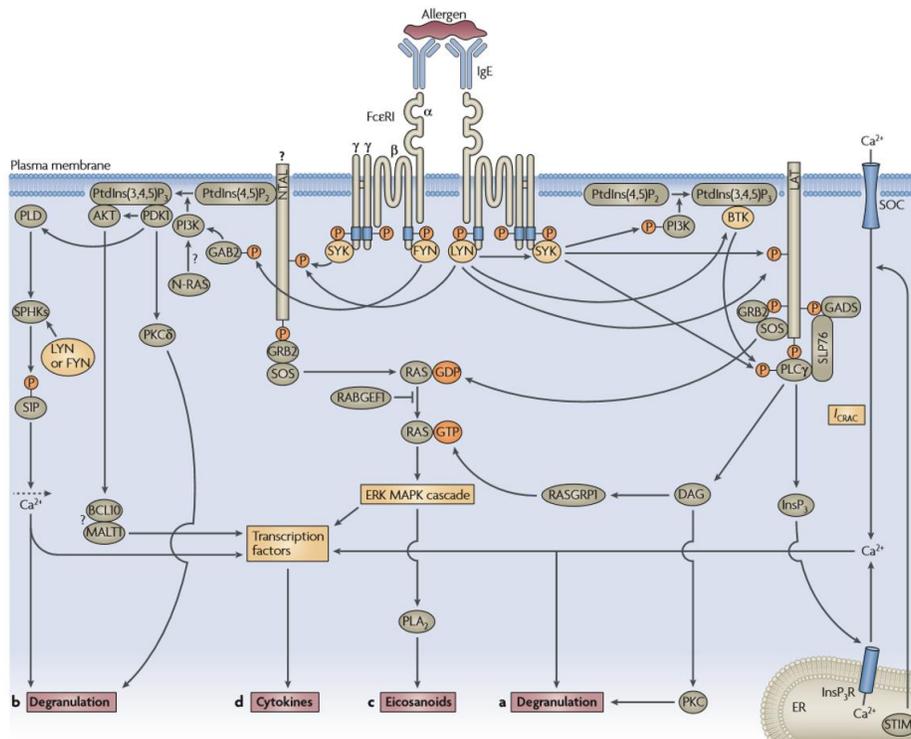


Figura 4. Receptor de alta afinidad por la fracción constante de la IgE (FcεRI). En respuesta a un antígeno ocurre el entrecruzamiento del receptor, este fenómeno desencadena la activación de diversos sistemas de señalización que conducen a la liberación del contenido granular (degranulación anafiláctica), la síntesis de novo de eicosanoides y la producción de citocinas. Tomado de Kraft & Kinet., 2007

1.5 Receptor Tipo Toll 4 (TLR4)

El receptor tipo Toll 4 (Figura 5) es un receptor de reconocimiento de patrones, que reconoce con alta especificidad al LPS bacteriano (Hoshino et al, 1999). Se encuentra conformado por un ectodominio en forma de espiral, un dominio de un solo paso transmembranal y un dominio intracelular homólogo al del receptor de IL-1 (TIR) (Pandey et al, 2015). El ectodominio posee repeticiones ricas en leucina (LRRs), por medio de las cuales el receptor establece interacciones homotípicas con el co-receptor MD2 y, además, reconoce al LPS. Mediante el dominio intracelular TIR, el TLR4 recluta proteínas adaptadoras que contienen al dominio TIR como son TIRAP, MyD88, TRAM, TRIF y SARM (Yamamoto & Akira, 2004).

El TLR4 se encuentra expresado en la membrana plasmática formando heterodímeros con el co-receptor MD2 (Nagai et al, 2002) y, dependiendo de la línea celular, con la molécula accesoria CD14 (Zanoni et al., 2011). Desde esta localización, el receptor es capaz de reconocer al LPS soluble y activar un sistema de señalización que culmina en la producción de citocinas pro-inflamatorias.

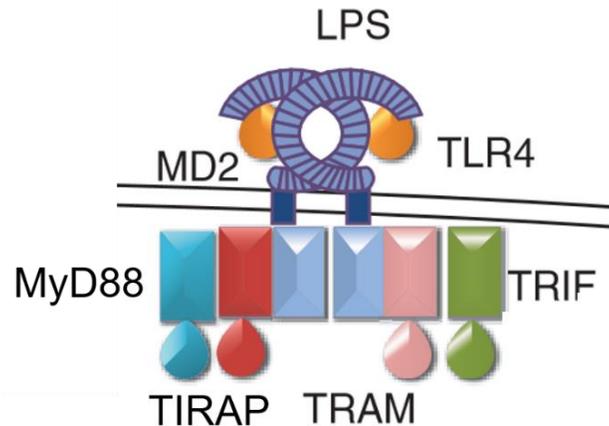


Figura 5. Estructura del complejo TLR4-MD2. El TLR4 se encuentra expresado en la membrana plasmática formando heterodímeros con MD2. La proteína está conformada por un dominio extracelular en forma de espiral que contiene repeticiones ricas en leucina (LRRs), un dominio de un paso transmembranal y un dominio citoplasmático homólogo al del receptor de IL-1 (TIR), mediante el cual el receptor recluta a los adaptadores TIRAP, MyD88, TRAM y TRIF. Modificado de Pandey et al, 2015.

1.5.1 Moléculas accesorias del TLR4

1.5.1.1 LPB

La proteína de unión al LPS (LPB) es una proteína de fase aguda, de 481 aminoácidos, cuya función principal es facilitar la desagregación y transporte del LPS hacia la molécula accesoria CD14, regulando de esta manera la activación del TLR4. También facilita el transporte de diversos PAMPs, entre los que se encuentran el ácido lipoteicoico (LTA), el peptidoglicano y lipopéptidos bacterianos, y así regula la función del TLR1, TLR2 y TLR6 (Lee et al., 2012)

1.5.1.2 MD-2

El MD2 es una proteína soluble, glicosilada, de 160 aminoácidos, que establece interacciones homotípicas con el ectodominio del TLR4. La principal función de MD2 es regular la expresión y dimerización del TLR4 en la superficie celular; además, es fundamental para el reconocimiento del LPS por el TLR4 (Shimazu et al., 1999; Nagai et al., 2002).

1.5.1.3 CD14

CD14 es una proteína transmembranal, no integral, que se encuentra unida a la cara externa de la membrana plasmática mediante un enlace covalente con el glicosilfosfatidilinositol (GPI). Funciona como un receptor de reconocimiento de patrones que forma parte del sistema molecular de reconocimiento y respuesta frente al LPS bacteriano (Jiang et al., 2005). Es fundamental para permitir la activación de la vía dependiente de TRIF del TLR4 (Jiang et al., 2005)

1.5.2 Sistema de reconocimiento del LPS

El LPS soluble es transportado por la proteína de unión al LPS (LBP) hacia la molécula accesoria CD14 (Lee et al., 2012); CD14 a su vez, transporta al LPS hacia el complejo TLR4-MD2 (Kagan & Medzhitov, 2002) y, mediante el recambio de fosfolípidos de membrana, permite que el TLR4 previamente activado pueda interactuar con los adaptadores TIRAP-MyD88 en la membrana plasmática y con TRAM-TRIF en los endosomas tempranos (Kagan & Medzhitov, 2002; Zanoni et al., 2011).

1.5.3 Sistema de señalización del TLR4

El sistema de señalización del TLR4 está conformado por la vía dependiente de MyD88 y la vía dependiente de TRIF. La vía dependiente de los adaptadores

TIRAP/MyD88 es activada desde la membrana plasmática y culmina con la producción de citocinas pro-inflamatorias, mientras que la vía dependiente de los adaptadores TRAM/TRIF es activada desde diversas localizaciones subcelulares (endosomas tempranos, macropinosomas y fagosomas) (Zanoni et al., 2011; Husebye et al., 2010) y culmina con la producción de citocinas con actividad reguladora en el sistema inmune.

1.5.3.1 Vía dependiente de MyD88

El reconocimiento del LPS por el complejo TLR4-MD2 desencadena cambios conformacionales en el receptor, que exponen al dominio TIR para que establezca interacciones homotípicas con el adaptador TIRAP. TIRAP es una proteína adaptadora que contiene un dominio de unión a fosfoinosítidos (PIP2) (Kagan & Medzhitov, 2002) mediante el cual se ancla a la membrana plasmática, y un dominio TIR mediante el cual establece interacciones homotípicas con el dominio TIR del TLR4 y de MyD88. (Kagan et al, 2006). La principal función de TIRAP es reclutar a MyD88 hacia el TLR4, para que este último ejerza sus funciones señalizadoras. Una vez reclutada hacia el TLR4, MyD88 establece interacciones con las cinasas IRAK4 e IRAK1/2 mediante sus dominios de muerte (DD), formando un centro de organización supramolecular (SMOC) con forma fibrilar denominado myddosma (Pandey et al, 2015). El myddosoma a su vez, recluta a la ubiquitin ligasa TRAF6, la cual mediante los intermediarios TAB1/2 activa a TAK1. Por una parte TAK1, a través de una cascada de fosforilaciones sucesivas, induce la fase temprana de activación de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) p38 y JNK (Arthur & Ley, 2013). Por otro lado, TAK1 activa al complejo de las IKK canónicas (IKK- α , IKK- β e IKK- γ) y este complejo induce la fosforilación de la cinasa TPL2 y la degradación del inhibidor del factor nuclear Kappa B ($\text{I}\kappa\text{B}$). TPL2 desencadena una cascada de fosforilaciones sucesivas que culminan con la activación de la MAPK ERK 1/2, mientras que la degradación del $\text{I}\kappa\text{B}$ favorece la fase temprana de activación de la subunidad p65 del NF- κB la cual, una vez activada, es translocada al núcleo y se une a los promotores de los genes de las citocinas pro-inflamatorias TNF, IL-6 e IL-

1 β . A este sistema de señalización se le conoce como vía dependiente de MyD88 y es ampliamente utilizado por la mayoría de los TLRs, a excepción del TLR3 el cual exclusivamente utiliza al adaptador TRIF para señalizar (Yamamoto et al., 2003), figura 6.

1.5.3.2 Vía dependiente de TRIF

Después de la activación de la vía dependiente de MyD88 desde la membrana plasmática, el TLR4 es internalizado y dirigido hacia endosomas tempranos. La internalización del receptor requiere de la presencia de la molécula accesoria CD14 y depende de la actividad GTPasa de la dinamina (Jiang et al, 2005; Kagan et al., 2008). Una vez localizado en los endosomas tempranos, el TLR4 recluta a las proteínas adaptadoras TRAM-TRIF, las cuales a su vez reclutan a la ubiquitin ligasa TRAF3, formando un centro de organización supramolecular denominado triffosoma, el cual induce la activación del complejo de las IKKs no canónicas (IKK ϵ y TBK1) (Fitzgerald et al., 2003; Sharma et al., 2003), además de la fase tardía de fosforilación del NF- κ B y las MAPK (Yamamoto et al., 2003; Kawai et al., 2001). Las IKKs no canónicas IKK ϵ y TBK1 activan al factor regulador de interferón 3 (IRF3), el cual una vez activado es translocado al núcleo donde controla la transcripción de genes que codifican para las citocinas reguladoras IFN tipo 1 (IFN α/β) e IL-10. (Hacker et al., 2006). A este sistema de señalización se le denomina vía dependiente de TRIF y es activado de forma exclusiva por el TLR3 y el TLR4 (Yamamoto et al., 2003). Sin embargo, existe evidencia que indica que la vía dependiente de TRIF del TLR4 no se activa en CC (Keck et al., 2011).

En resumen, las diferencias espaciales que existen en la activación de las vías dependientes de MyD88 (desde la membrana plasmática) y de TRIF (localizaciones intracelulares) condicionan que la activación del NF- κ B y de las MAPKinasas ocurra en 2 fases sucesivas, la fase temprana (0 a 30 minutos) es inducida por MyD88 y la fase tardía (1-2 horas) es inducida por el adaptador TRIF.

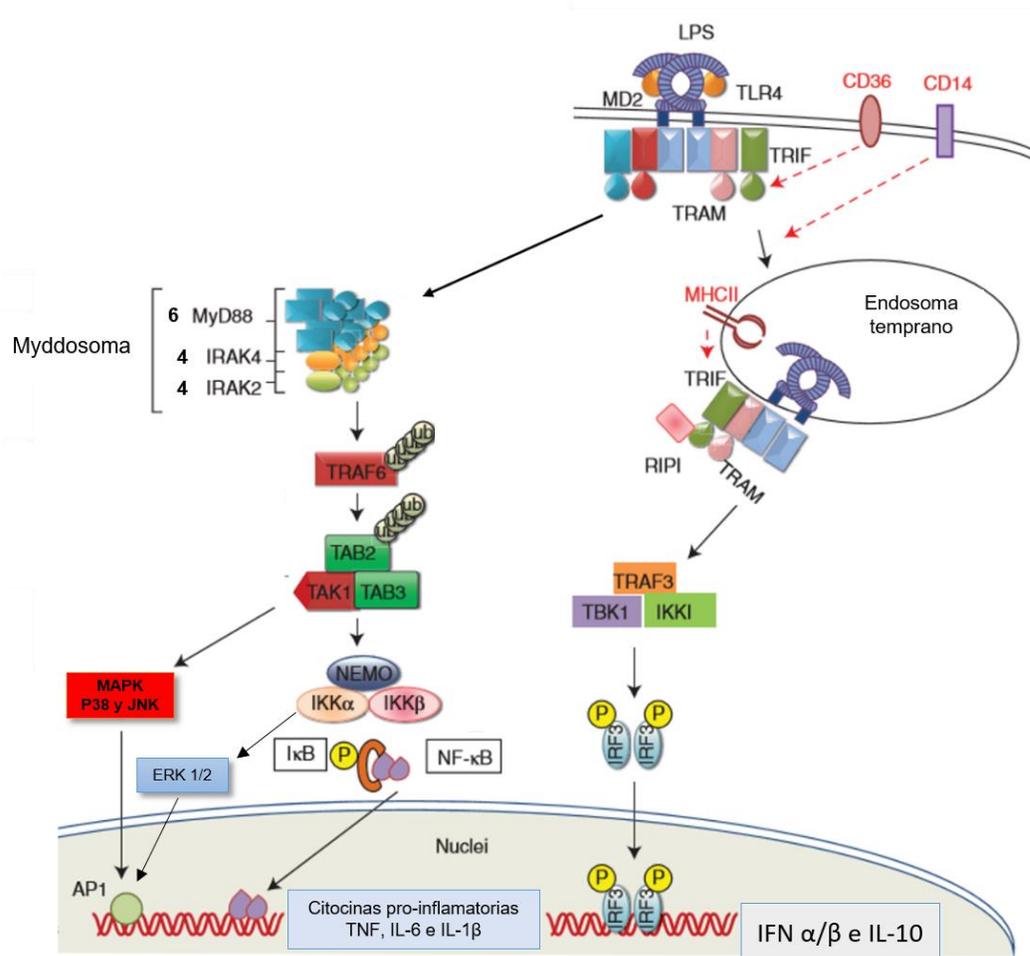


Figura 6. Sistema de señalización del TLR4. La activación del complejo TLR4-MD2 por el LPS desde la membrana plasmática, induce cambios conformacionales en el receptor que permiten el reclutamiento de los adaptadores TIRAP y MyD88, desencadenando la activación del eje TRAF6-TAK1. TAK1 induce la activación de las MAPK p38 y JNK, así como del complejo de las IKKs canónicas (IKK α , IKK β e IKK γ), que media la activación y translocación nuclear del NF- κ B, por una parte, y la fosforilación de TPL2 con la subsecuente producción de citocinas pro inflamatorias TNF, IL-6 e IL-1 β . La expresión de CD14 determina que el complejo TLR4-MD2 pueda ser internalizado y transportado hacia endosomas tempranos, sitio donde el receptor es capaz de establecer interacciones con los adaptadores TRAM y TRIF, los cuales activan al eje TRAF3-TBK1. TBK1 induce la fosforilación y translocación nuclear del IRF3, promoviendo la producción de los IFN tipo 1 (IFN alfa y beta). Modificado de Pandey et al, 2015.

1.6 Tráfico vesicular del TLR4

El número de receptores tipo Toll 4 disponibles para reconocer al LPS depende del balance entre la translocación del receptor en la membrana plasmática y su degradación en lisosomas. Después de su síntesis en el retículo endoplásmico rugoso (RER), el TLR4 sufre diversas modificaciones pos-traduccionales realizadas por las proteínas chaperonas residentes del RER denominadas Gp96 y PRAT4A. Gp96 se une a la forma inmadura del TLR4 y permite su asociación con el co-receptor MD2, formando el complejo TLR4-MD2 (Yang et al., 2007); a continuación PRAT4A induce la N-glicosilación de dicho complejo y posteriormente ocurre su empaquetamiento, transporte y expresión en la membrana plasmática (Wakabayashi et al., 2006).

La activación del TLR4 por el LPS desde la membrana plasmática induce la activación de la vía dependiente de MyD88, que conduce a la producción de citocinas pro-inflamatorias. Sin embargo, el mismo reconocimiento del LPS por el TLR4 activa a una enzima con actividad E3 ubiquitin ligasa, denominada TRIAD3A, la cual se une al TLR4 por medio de interacciones con el dominio TIR y así ubiquitina al receptor (Chuang et al., 2004). Una vez ubiquitinado el TLR4 es internalizado y transportado hacia endosomas tempranos y subsecuentemente a endosomas tardíos, por un mecanismo dependiente de clatrina y dynamina. Estos mecanismos son regulados por la cinasa Hrs (Husebye et al., 2006). Dentro de los endosomas tempranos el TLR4 activa la vía dependiente de los adaptadores TRAM/TRIF conduciendo a la producción específica de interferones tipo 1 (Kagan et al., 2008). En cambio, cuando el receptor se encuentra dentro de endosomas tardíos, la alta concentración de iones H^+ induce la desnaturalización del complejo TLR4-MD2, concluyendo con la señalización del complejo receptor (Saitoh et al., 2009). Subsecuentemente, el TLR4 es transportado y degradado en lisosomas por un mecanismo dependiente de la GTPasa Rab7a

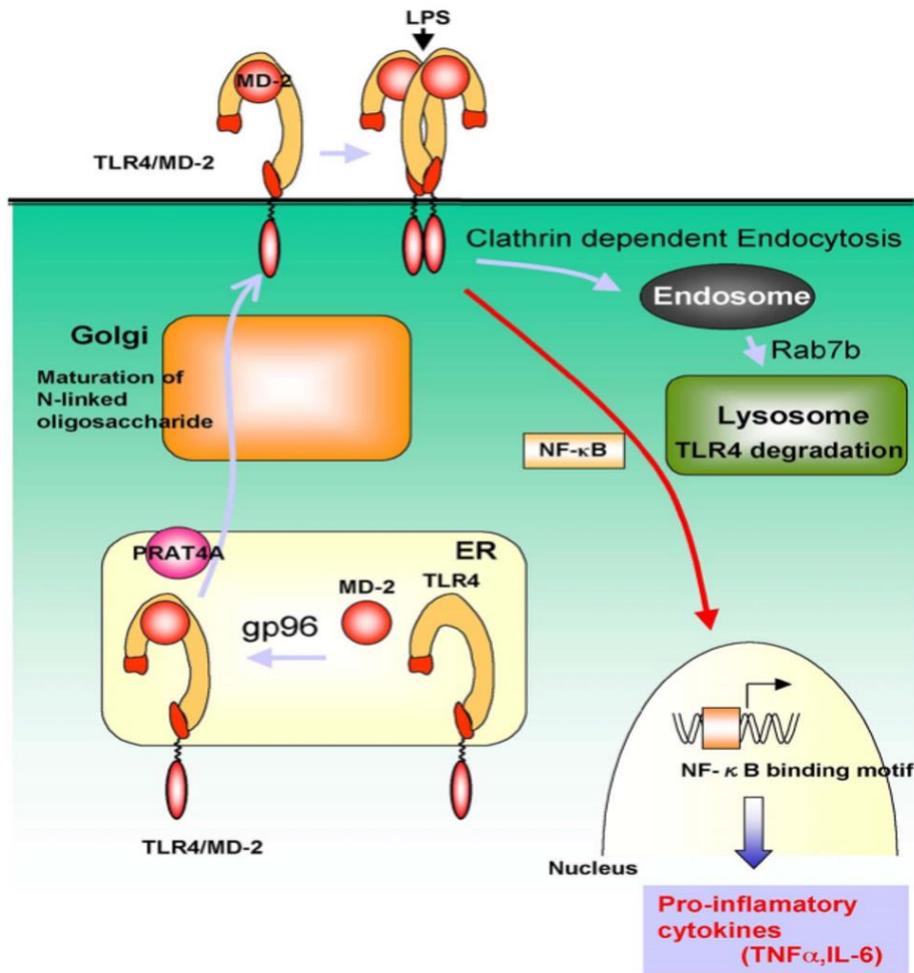


Figura 7. Tráfico vesicular del TLR4. Después de su síntesis en el retículo endoplásmico rugoso, el TLR4 sufre diversas modificaciones pos-traduccionales mediadas por las chaperonas Gp96 y PRAT4A, las cuales marcan al receptor para su empaquetamiento en el aparato de Golgi y su transporte hacia la membrana plasmática. Una vez localizado en la membrana plasmática, el complejo TLR4-MD2 es activado por el LPS, lo cual induce su internalización y transporte hacia endosomas tempranos y tardíos, donde el pH ácido induce la desnaturalización del complejo TLR4-MD2, terminando con la señalización. Finalmente el TLR4 es transportado hacia lisosomas donde es degradado Tomado de Saitoh et al., 2009

1.7 CD14 regula la activación de la vía dependiente de MyD88 y la vía dependiente de TRIF del TLR4

La activación de CD14 por el LPS soluble desencadena diversos eventos bioquímicos que regulan la señalización del TLR4. CD14 favorece la vía dependiente de MyD88 al transportar el LPS hacia el complejo TLR4-MD2 y al inducir la activación del eje $\beta 2$ integrina-ARF6-PI5K (Kagan et al., 2006), con el objetivo de concentrar al PIP2 en la membrana plasmática y así reclutar a TIRAP hacia el TLR4. Cabe resaltar que CD14 resulta fundamental para activar este sistema transduccional sólo cuando las concentraciones de LPS extracelular son muy bajas, de otra forma sistemas celulares carentes de CD14 conservan la capacidad de activar la vía dependiente de MyD88 (figura 8).

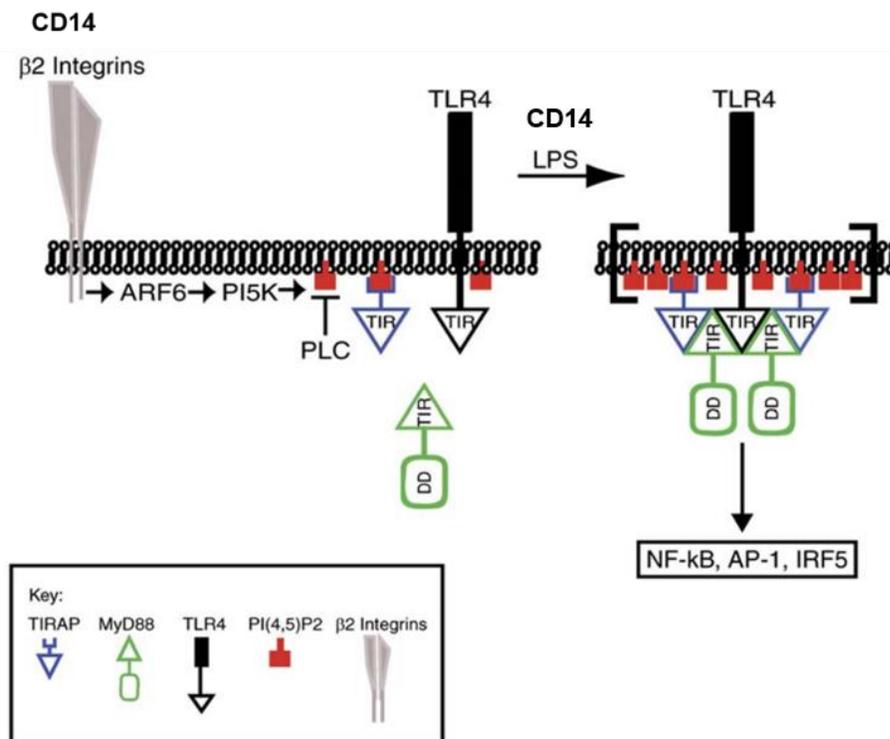


Figura 8. El co-receptor CD14 favorece la activación de la vía dependiente de MyD88 del TLR4. CD14 establece interacciones con la $\beta 2$ -integrina desencadenando un sistema de señalización (eje ARF6-PI5K) que concentra al PIP2 en la membrana plasmática, adyacente al complejo TLR4-MD2, favoreciendo el reclutamiento del adaptador TIRAP por el TLR4. Por otra parte, CD14 transporta el LPS hacia el complejo TLR4-MD2. Modificado de Kagan et al., 2006.

Por otra parte, CD14 induce la activación de una cascada de señalización que activa a la cinasa Syk y a la fosfolipasa C gamma2 (Zanoni et al., 2011), desencadenando la internalización y el transporte del TLR4 hacia endosomas tempranos, sitio donde se activa la vía dependiente de TRIF y en consecuencia la producción de IFN tipo 1 (figura 9). En resumen, CD14 desempeña una función importante en la activación del sistema de señalización del TLR4, siendo fundamental para la activación de la vía dependiente de TRIF (Jiang et al., 2005) y poco relevante para la vía dependiente de MyD88

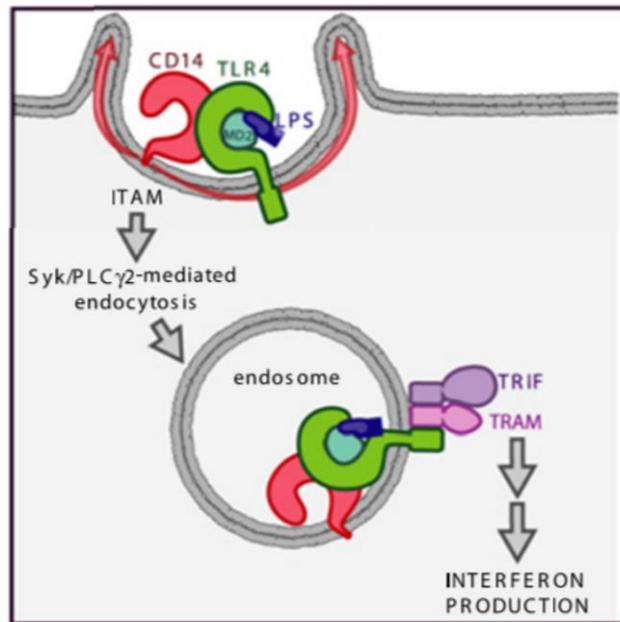


Figura 9. El co-receptor CD14 induce la internalización del TLR4 y la producción de IFN tipo 1. CD14 estimula la activación del eje SYK-PLCγ2 y, como consecuencia, induce la internalización del complejo TLR4-MD2 hacia endosomas tempranos, promoviendo la activación de la vía dependiente de TRIF, con la consecuente producción de IFN tipo 1. Tomado de Zanoni et al., 2011

1.8 El rol de las células cebadas como reguladores de las respuestas inflamatorias en modelos “in vivo”

Una evidencia que indica la existencia de la vía dependiente de TRIF en CC fue aportada por el grupo de Chan y cols., quienes demostraron que las células cebadas residentes del epitelio vesical producen IL-10 en respuesta a bacterias Gram negativas. La IL-10 ejerce acciones antiinflamatorias y evita el desarrollo de respuestas inmunológicas adaptativas y de memoria, estableciendo un estado de tolerancia periférica local, que hace a la vejiga un órgano inmunoprivilegiado, susceptible a infecciones recurrentes por E. Coli (Figura 10), por lo que es probable que dicho estado de tolerancia tenga como propósito evitar reacciones inflamatorias exacerbadas y recurrentes ante productos de desecho.

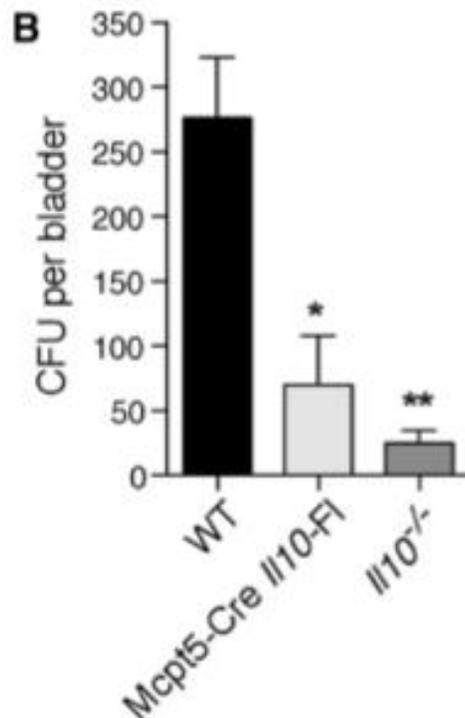


Figura 10. La IL-10 producida por las CC residentes del epitelio vesical limita el aclaramiento bacteriano. En vejigas de ratones en los que específicamente las CC carecen de IL-10 (Mcpt5-Cre IL10-FL), aumenta el aclaramiento de colonias bacterianas de forma significativa respecto de los WT. Tomado de Chan et al., 2013

2. ANTECEDENTES

Existe controversia respecto a la activación de los sistemas de señalización intracelulares del TLR4 en CC. Un grupo de investigación reportó que en BMMCs diferenciadas *in vitro*, no se activa la vía intracelular dependiente de TRIF en respuesta al LPS, sin embargo, las CC utilizadas en ese estudio no expresaban CD14 (Keck et al., 2011) y el quimiotipo de LPS utilizado en ese trabajo sesga la señalización hacia la vía dependiente de MyD88 en ausencia de CD14 (figura 12)

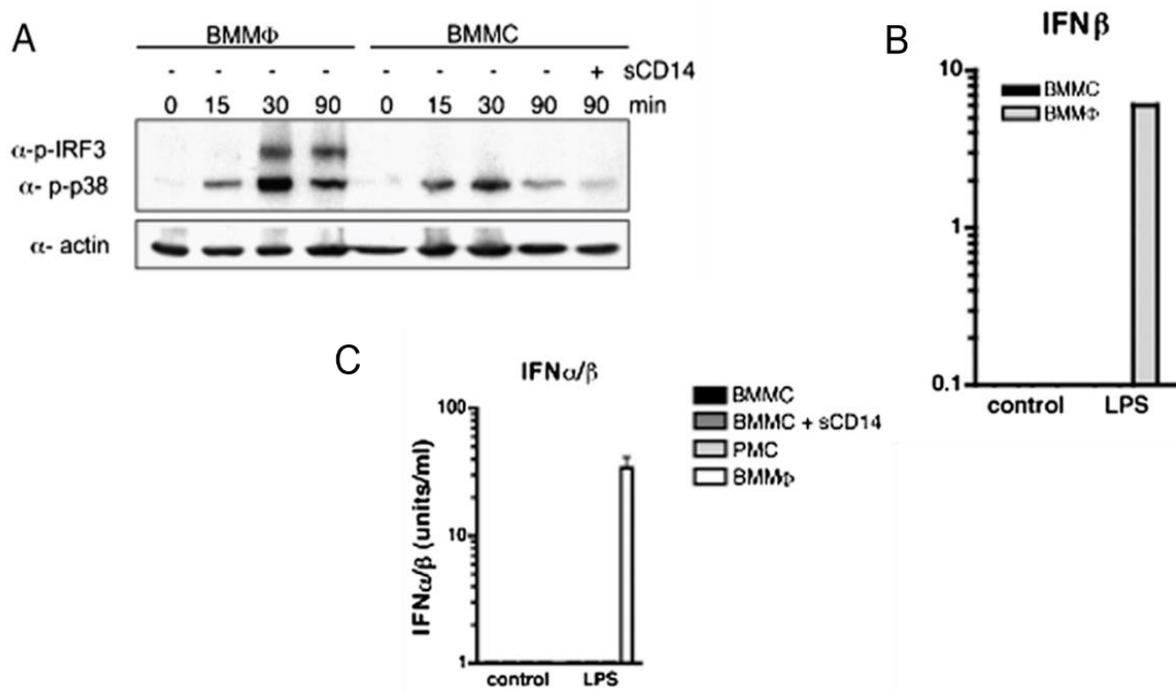


Figura 11. Ausencia de la vía endosómica de señalización del TLR4 en BMMCs.

A. Inmunoblot que muestra la ausencia de fosforilación del factor regulador de interferón 3 (IRF3) en respuesta al LPS en BMMCs. B. Ausencia de inducción del RNA mensajero de IFN-β en respuesta al LPS en BMMCs. C. ELISA que muestra la ausencia de la secreción de IFN-α/β en respuesta al LPS en BMMCs. Modificado de Keck et al., 2011.

En contraparte, nuestro grupo de trabajo ha encontrado evidencias indirectas de la señalización intracelular del TLR4. Por ejemplo, encontramos que cuando las BMMCs son sensibilizadas con IgE, aumenta la expresión de las moléculas accesorias CD14 y MD2 (figura 12) (Medina-Tamayo et al., 2011)

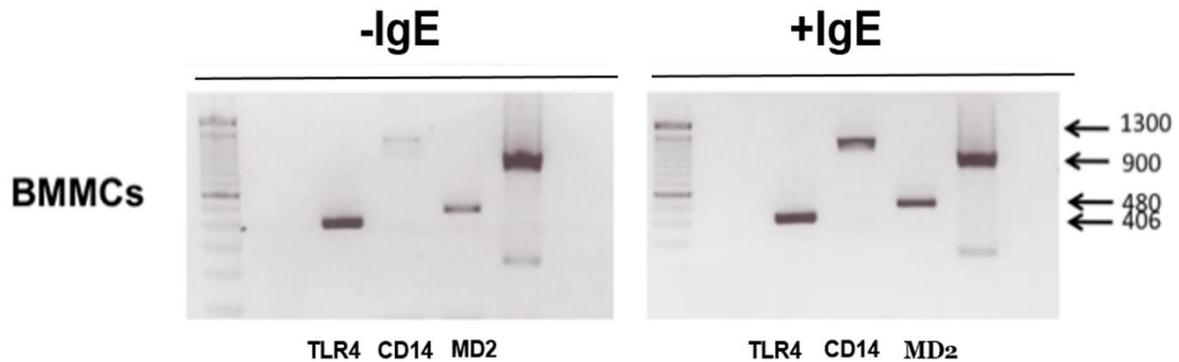


Figura 12. La sensibilización de las BMMCs con IgE monomérica induce un aumento en la expresión del RNA mensajero de los co-receptores CD14 y MD2. Imagen proporcionada por Alfredo Ibarra-Sánchez (en proceso de publicación)

Además en esas mismas condiciones, detectamos en las BMMCs inmunoreactividad del TLR4 y de CD14, en el interior de las células (figura 13).

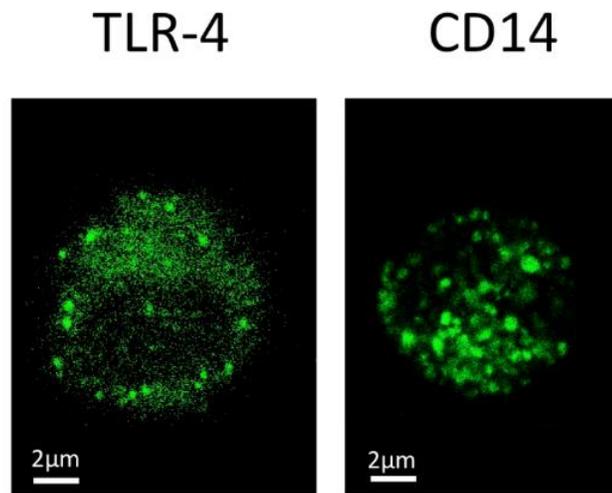


Figura 13. Inmunoreactividad intracelular del TLR4 y de CD14. En BMMCs sensibilizadas con IgE durante 24 horas se detecta la inmunoreactividad del TLR4 y de la molécula accesoria CD14 en localizaciones intracelulares (Ibarra-Sánchez, 2016).

Otra evidencia aportada por nuestro grupo de trabajo indica que las BMMCs activan la expresión del RNA mensajero de IL-10 en respuesta al LPS (figura 14).

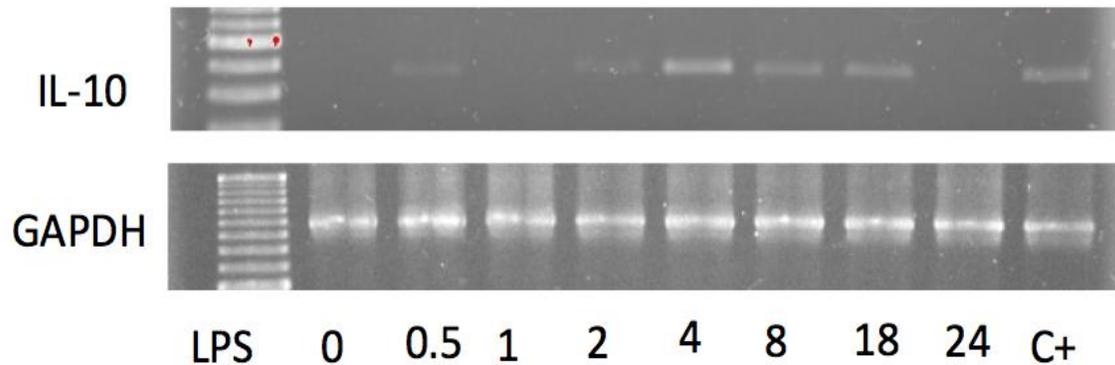


Figura 14. En BMMCs la estimulación con LPS induce la expresión de IL-10 (Espinosa Riquer, 2016).

Las evidencias de la literatura y de nuestro laboratorio hacen pensar que los sistemas de señalización intracelulares del TLR4 pudieran ser funcionales en BMMCs, bajo ciertas condiciones (como la presencia de IgE monomérica). De ser así, su caracterización ayudará a entender el papel de estas células en la protección del huésped frente a bacterias Gram negativas y en el control tardío de las reacciones inflamatorias.

3. JUSTIFICACION

En la actualidad el sistema de señalización del TLR4 ha sido poco estudiado en CC. Sin embargo, debido a la importancia que tienen las CC en la protección del huésped contra infecciones por bacterias Gram negativas, en la resolución de los procesos inflamatorios y en la fisiopatología de enfermedades crónicas degenerativas, además de la relación que existe entre las alergias y las infecciones, es importante caracterizar las cascadas de señalización activadas por el LPS en este tipo celular.

4. HIPÓTESIS

En células cebadas derivadas de médula ósea, previamente sensibilizadas con IgE monomérica, la estimulación con LPS permitirá la internalización del TLR4 y la activación de los sistemas de señalización intracelulares.

5. OBJETIVO GENERAL

Recolectar evidencia de la existencia o ausencia de posibles vías de señalización intracelular activadas por el LPS en células cebadas.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar la posible existencia de vías de señalización intracelulares activadas por el LPS en CC mediante el estudio del curso temporal de fosforilación de proteínas específicas después del estímulo.
2. Determinar si la activación ERK1/2, p38 y NF- κ B en respuesta al LPS depende de la dinamina.
3. Analizar la translocación intracelular del receptor TLR4 y del co-receptor CD14 en respuesta al LPS en BMMCs.
4. Analizar el papel de la dinamina en la translocación intracelular del receptor TLR4 y del co-receptor CD14 en respuesta al LPS en BMMCs.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Obtención y cultivo de CC de origen murino

Las CC se obtuvieron a partir de la médula ósea de ratones con fondo genético C57BL6, silvestres, de 4 y 8 semanas de edad (BMMCs). La médula ósea se obtuvo mediante el lavado del fémur con medio de cultivo RPMI-1640 (Biofluidos) (SIGMA, cat. R4130-IL) complementado con L-glutamina (SIGMA, cat R4130), al cual se le adicionó IL-3 de origen murino (Preprotech, cat 213-13X) y suero fetal bovino (FBS al 10%, GIBCO, _BRL, cat 261400779), el cual se disgregó en cajas de Petri estériles a las que se les añadió medio RPMI (ANEXO II). Posteriormente, la médula ósea extraída se colocó en cajas de cultivo Nunc T-75, con 30 mL de medio de cultivo RPMI y se pusieron en una incubadora BINDER a 37° C, con CO₂ al 5%, realizando cambios de medio cada 7 días. Después de 4 semanas, se comprobó el fenotipo celular midiendo la expresión del receptor FcεRI en la membrana plasmática mediante citometría de flujo. Cuando los cultivos cumplieron 6 semanas de edad, las BMMCs fueron utilizadas para los siguientes experimentos.

7.2 Sensibilización con IgE monomérica

Para todos los experimentos las BMMCs fueron sensibilizadas con 100 ng/mL de IgE anti DNP HSA (Dinitrofenol de albúmina sérica humana) durante 24 horas, a una temperatura de 37° C, con una atmósfera de CO₂ al 5%, en medio RPMI.

7.3 Estimulación del receptor TLR4

Dos millones de BMMCs fueron sometidas a estimulación del TLR4, a través de la adición de 500 ng/mL LPS de E. coli serotipo 026:B6 (SIGMA, cat L8274-100MG) al medio RPMI durante diferentes periodos de tiempo, a 37° C.

7.4 Pre-incubación con dynasore (inhibidor de dinamina)

Dos millones de BMMCs se preincubaron con dynasore a una concentración de 80 μ M, 30 minutos antes de iniciar la estimulación con LPS.

7.5 Determinación de proteínas en extractos totales (Western Blot)

Dos millones de BMMCs, preincubadas con dynasore a una concentración de 80 μ M durante 30 minutos, se estimularon con 500 ng/m de LPS durante 0, 15, 30 y 60 minutos. Al finalizar la estimulación las muestras se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos. Enseguida se decantó el sobrenadante y el pellet fue re-suspendido en 200 μ l de Laemmli 1x, 8 μ l de β -mercaptoetanol y 8 μ l de ortovanadato de sodio. Los extractos fueron sometidos a ebullición, durante 30 minutos y posteriormente fueron almacenados a -80° C. Para realizar la electroforesis las muestras se sometieron a ebullición durante 10 minutos, posteriormente se tomaron 15 μ l de cada muestra y se cargaron en un gel de acrilamida/bisacrilamida SDS al 8% y 10% respectivamente. Las muestras fueron corridas a 50 mA, en un amortiguador de TRIS-Glicina-SDS, con un pH de 8.3 durante aproximadamente 2 horas. Una vez que finalizó la electroforesis se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (Immobilon-P®, cat. IPVH00010). El sándwich de transferencia se realizó de acuerdo al protocolo de Invitrogen y se empleó un amortiguador Tris-Glicina-Metanol con un pH de 8.3 frío. La transferencia fue realizada a 25 V con 400 mA de corriente durante 1 hora. Al término la membrana de PVDF fue bloqueada con leche descremada al 5% (Svelty de Nestlé) durante 2 horas. Una vez finalizado el bloqueo, la membrana fue incubada con anticuerpos primarios anti-p-NF- κ B (Dilución 1:5000), anti-p-p38 (dilución 1:5000), anti-p-ERK 1/2 (dilución 1:5000) y anti- β -Actina durante toda la noche. Al día siguiente los anticuerpos primarios se retiraron y el PVDF se lavó en amortiguador TBS-T 1x 3 veces, durante 10 minutos. Posteriormente la membrana PVDF se incubó con los anticuerpos secundarios anti-conejo (p-p65, p-p38 y p-ERK 1/2) (dilución 1:10000) y anti-ratón (anti- β -actina) (dilución 1:10000) durante 1 hora a temperatura

ambiente y al terminar la membrana de PVDF se lavó 3 veces, durante 10 minutos, en TBS-T. Finalmente se procedió a la detección de las proteínas por medio de soluciones para la reacción de quimioluminiscencia Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP substrate (cat, WBKLS0100), exponiendo placas de rayos X de KODAK de 1 a 10 minutos.

7.6 Inmunofluorescencia

Un millón de BMMCs fueron preincubadas con dynasore (80 μ M) o únicamente en medio de cultivo durante 15 minutos, posteriormente fueron estimuladas con LPS (500 ng/ml) durante 15 y 30 minutos. La reacción finalizó por centrifugación a 4° C, a 1500 rpm, durante 5 minutos. Posteriormente se decantó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 200 μ l de PBS 1 X y se colocó en una laminilla electrocargada durante 20 minutos. A continuación se retiró el PBS 1 X y se adicionaron 200 μ l de PFA al 4%. Posteriormente las células se incubaron en una cámara húmeda, a temperatura ambiente, durante 15 minutos. A continuación se lavó la laminilla con PBS 1 X, en tres ocasiones, para retirar el exceso de PFA. Se adicionaron 200 μ l de solución de bloqueo y posteriormente se incubaron a temperatura ambiente por 2 horas. Se retiró la solución de bloqueo y se incubaron con el anticuerpo primario (anti-TLR4 , anti-CD14 FITC) durante toda la noche. Las laminillas se lavaron con PBS-T en 5 ocasiones y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario, durante 2 horas, a temperatura ambiente. Se realizaron 5 lavados en PBS-T en 5 ocasiones. A continuación las laminillas se incubaron con DAPI durante 5 minutos, a temperatura ambiente. Se realizaron 5 lavados en PBS-T y después con agua en 2 ocasiones. Se añadió DABCO y a continuación se selló la laminilla con esmalte transparente. Finalmente las laminillas se observaron al microscopio confocal.

7.7 Análisis estadístico

Los datos se expresan como el promedio +/- el error estándar de la media (+/-SEM) y se analizaron utilizando un ANOVA de 1 vía seguida de Bonferroni como prueba post-hoc.

8. RESULTADOS

Curso temporal de la fosforilación de NF- κ B inducida por LPS

Para analizar la posible contribución de la señalización intracelular del TLR4 en la fase tardía de activación del factor de transcripción NF- κ B, decidimos realizar un curso temporal de 4 horas de estimulación con LPS y posteriormente mediante western blot medir la fosforilación de la subunidad p65 del NF- κ B

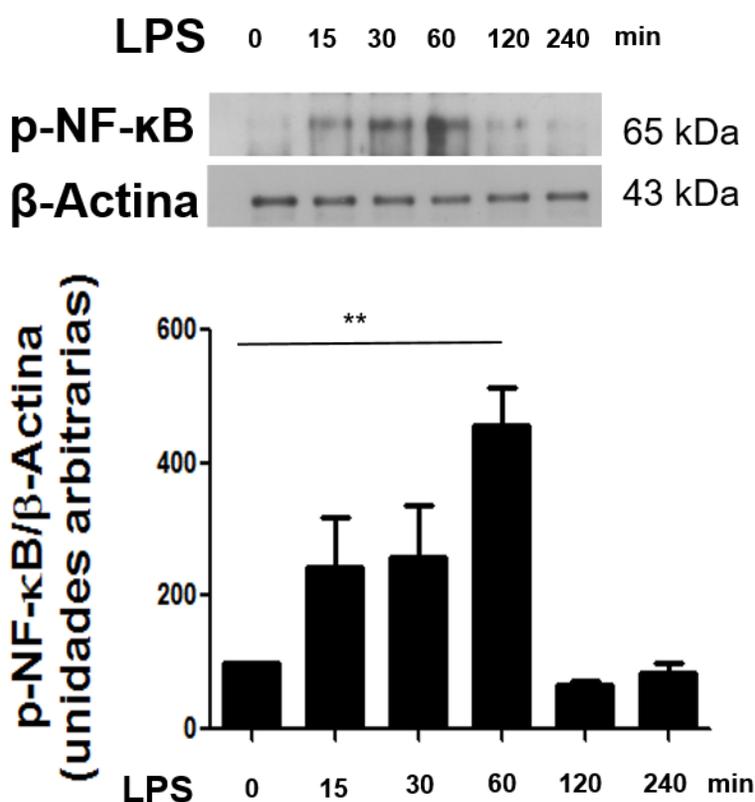


Figura 15. Curso temporal de la fosforilación de NF- κ B inducida por LPS. Inmunoblot representativo. 2 millones de BMMCs se estimularon durante 0, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos con LPS; la reacción finalizó por centrifugación a 4^o C, posteriormente fueron re-suspendidas en buffer de lisis para obtener extractos de proteínas totales con los cuales se realizó western blot contra p-NF- κ B. ANOVA de 1 vía seguida de Bonferroni, **p < 0.01; n=4.

Curso temporal de la fosforilación de p38 α/β inducida por LPS

Para analizar la posible contribución de la señalización intracelular del TLR4 en la fase tardía de activación de la MAP cinasa p38, decidimos realizar un curso temporal de 4 horas de estimulación con LPS y posteriormente mediante western blot medir la fosforilación de p38

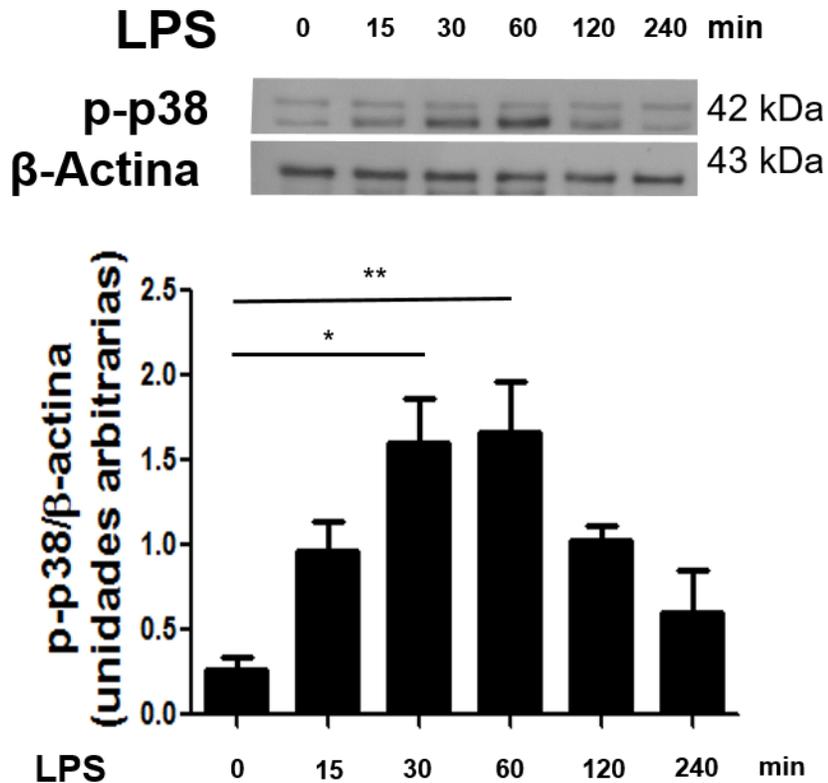


Figura 16. Curso temporal de la fosforilación de la MAPK p38 inducida por LPS. Inmunoblot representativo. Dos millones de BMMCs fueron estimuladas durante 0, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos con LPS, la reacción finalizó por centrifugación a 4° C. Posteriormente fueron resuspendidas en buffer de lisis para obtener extractos de proteínas totales con los cuales se realizó un western blot contra p-p38. ANOVA de 1 vía seguida de Bonferroni *p < 0.05, **p < 0.01; n=3

Curso temporal de la fosforilación de ERK 1/2 inducida por LPS

Para analizar la posible contribución de la señalización intracelular del TLR4 en la fase tardía de activación de la MAP cinasa ERK, decidimos realizar un curso temporal de 4 horas de estimulación con LPS y posteriormente mediante Western blot medir la fosforilación de ERK 1/2

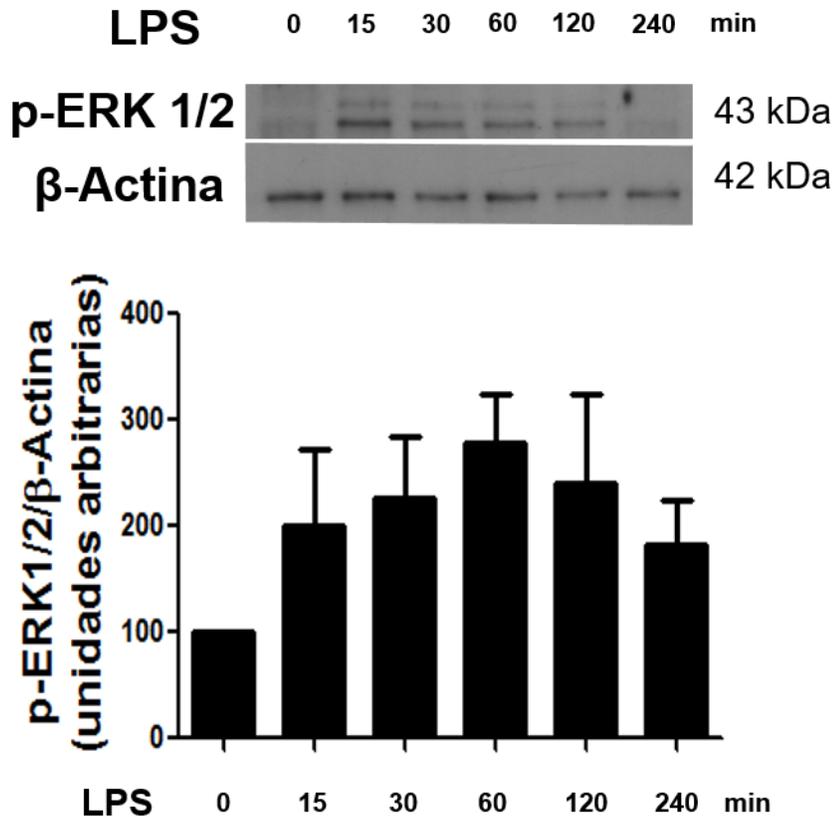


Figura 17. Curso temporal de la fosforilación de la MAPK ERK 1/2 inducida por LPS.

Inmunoblot representativo. Dos millones de BMMCs fueron estimuladas durante 0, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos con LPS, la reacción finalizó por centrifugación a 4° C. Posteriormente fueron resuspendidas en buffer de lisis para obtener extractos de proteínas totales con los cuales se realizó un Western blot contra p-ERK. ANOVA de 1 vía, ns ; n= 7

Determinación del efecto de la dinamina sobre la fosforilación de NF- κ B

Para evaluar el efecto de la actividad de la dinamina sobre la fosforilación del NF- κ B, decidimos preincubar a las BMMCs con dynasore (un inhibidor selectivo de la actividad GTPasa de la dinamina) y posteriormente realizar un curso temporal de 0 a 60 minutos de estimulación con LPS y, mediante Western blot, analizar la fosforilación del NF- κ B

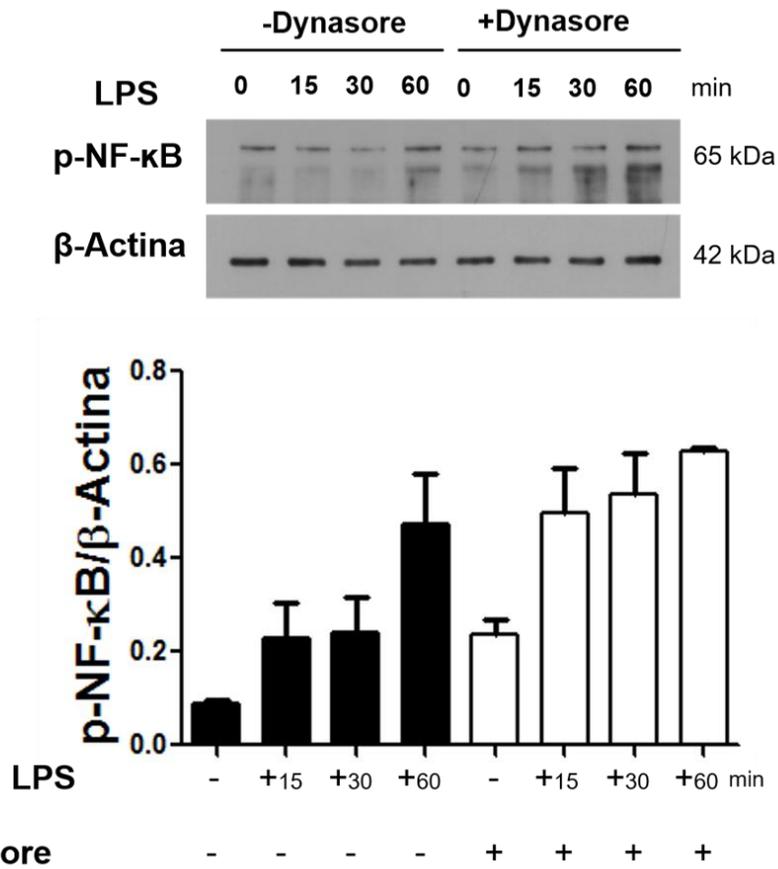


Figura 18. Efecto del dynasore sobre la fosforilación de NF- κ B inducida por LPS.

Inmunoblot representativo. Dos millones de BMMCs fueron preincubadas con dynasore (80 μ M) o en medio de cultivo durante 30 minutos; posteriormente fueron estimuladas con LPS durante 0, 15, 30 y 60 minutos. La reacción finalizó por centrifugación a 4^o C y a continuación fueron resuspendidas en buffer de lisis para obtener los extractos de proteínas totales, con los cuales se realizó un Western blot contra p-NF- κ B. ANOVA de 1 vía ns; n=3.

Determinación del efecto de la dinamina sobre la fosforilación de la MAP cinasa p38

Para evaluar el efecto de la actividad de la dinamina sobre la fosforilación de la MAP cinasa p38, decidimos preincubar a las BMMCs con dynasore y posteriormente realizar un curso temporal de 0 a 60 minutos de estimulación con LPS y, mediante Western blot, analizar la fosforilación de p38.

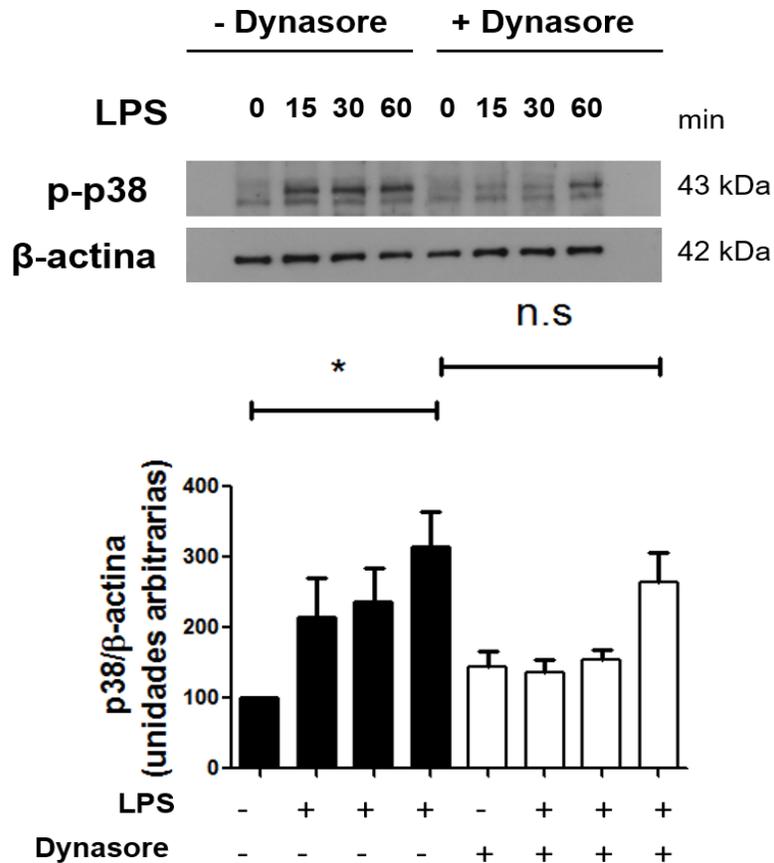


Figura 19. Efecto del dynasore sobre la fosforilación de p38 inducida por LPS.

Inmunoblot representativo. Dos millones de BMMCs fueron preincubadas con dynasore (80μM) o únicamente en medio de cultivo durante 30 minutos. Posteriormente fueron estimuladas con LPS durante 0, 15, 30 y 60 minutos, la reacción finalizó por centrifugación a 4° C y a continuación fueron resuspendidas en buffer de lisis para obtener extractos de proteínas totales con los cuales se realizó un Western blot contra p-p38. ANOVA de 1 vía seguida de Bonferroni, *p < 0.05; n=3.

Determinación del efecto de la dinamina sobre la fosforilación de la MAP cinasa ERK 1/2

Para evaluar el efecto de la actividad de la dinamina sobre la fosforilación de la MAP cinasa ERK, decidimos preincubar a las BMBCs con dynasore, posteriormente realizar un curso temporal de 0 a 60 minutos de estimulación con LPS y mediante western blot analizar la fosforilación de ERK 1/2

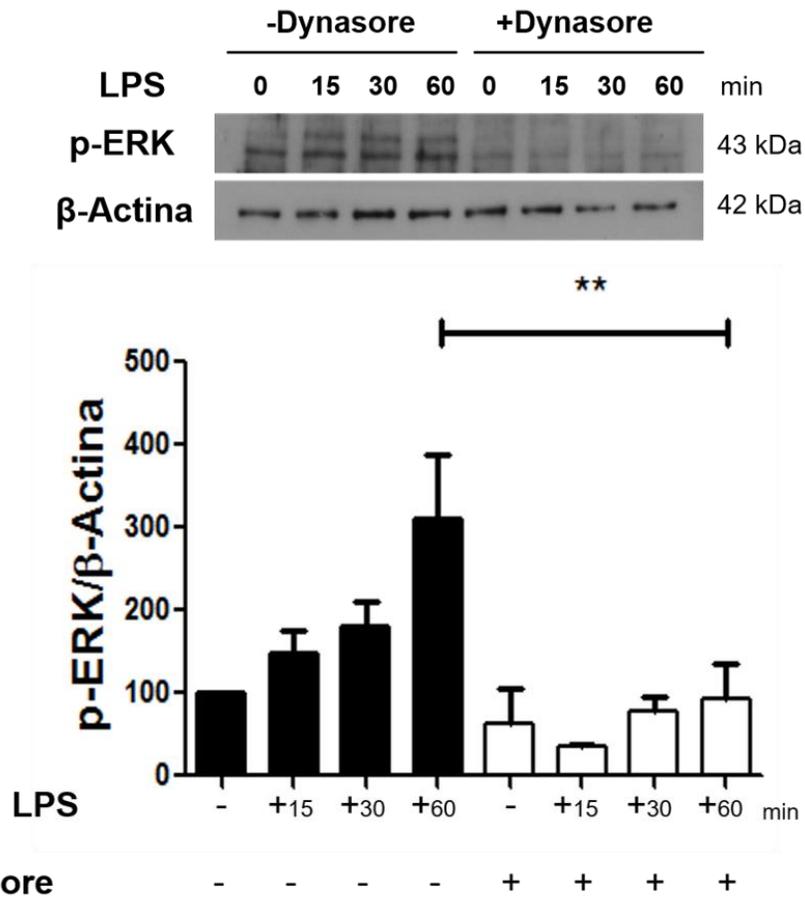


Figura 20. Efecto del dynasore sobre la fosforilación de ERK 1/2 inducida por LPS.

Inmunoblot representativo. Dos millones de BMBCs fueron preincubadas con dynasore (80 μ M) o únicamente en medio de cultivo durante 30 minutos. Posteriormente fueron estimuladas con LPS durante 0, 15, 30 y 60 minutos, la reacción finalizó por centrifugación a 4° C y a continuación fueron resuspendidas en buffer de lisis para obtener los extractos de proteínas totales, con los cuales se realizó un Western blot contra p-ERK 1/2. ANOVA de 1 vía seguida de Bonferroni, ** $p < 0.01$; $n=3$.

Determinación de la translocación de CD14 en respuesta al LPS y su sensibilidad a dynasore

Para determinar si en respuesta al LPS ocurre la internalización del co-receptor CD14 y si ésta depende de la dinamina, decidimos preincubar a las BMMCs con dynasore o únicamente con medio y posteriormente adicionar LPS durante 0, 15 y 30 minutos, y mediante una microscopía confocal analizar la fluorescencia perinuclear de CD14-FITC

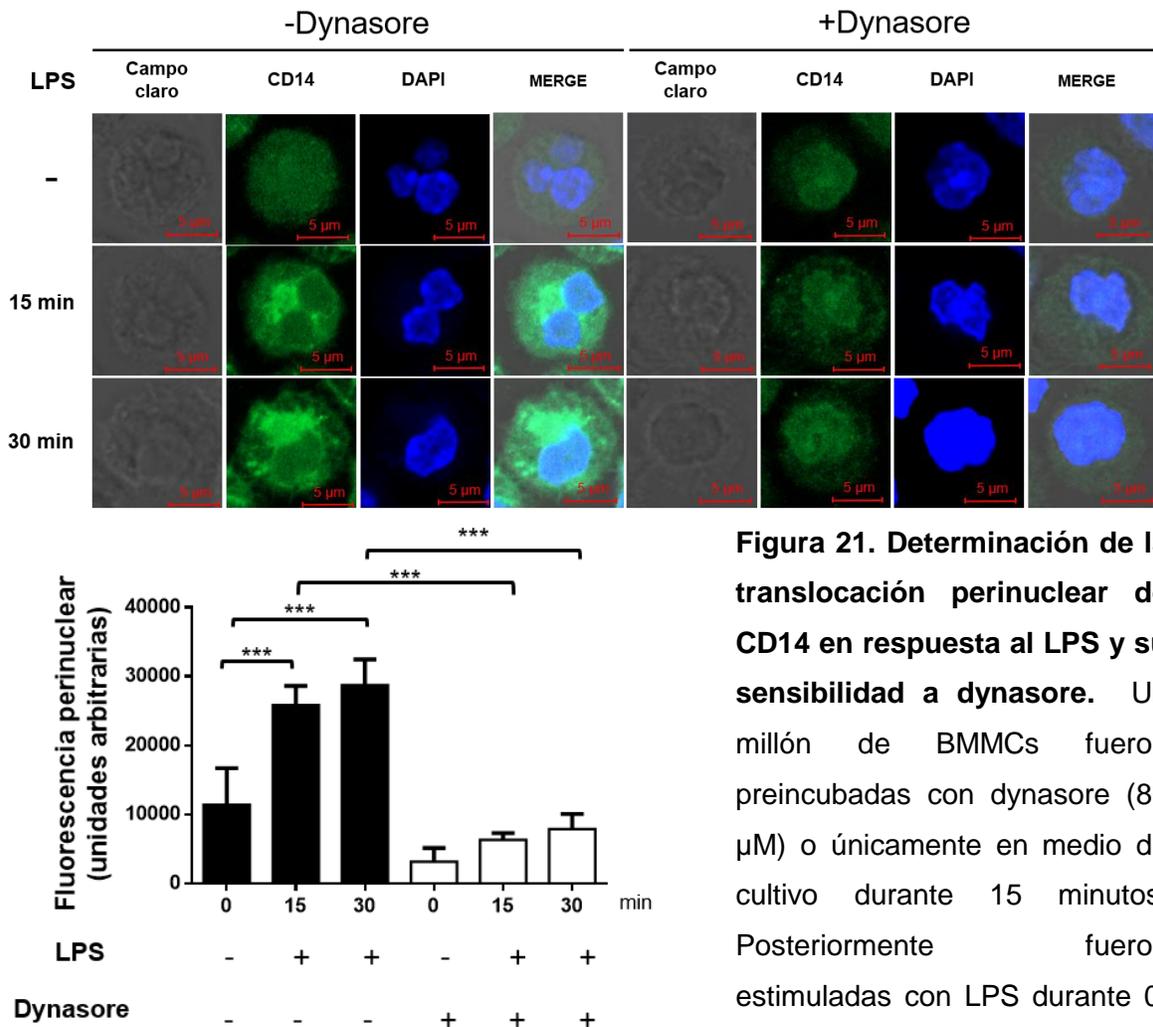


Figura 21. Determinación de la translocación perinuclear de CD14 en respuesta al LPS y su sensibilidad a dynasore. Un millón de BMMCs fueron preincubadas con dynasore (80 μ M) o únicamente en medio de cultivo durante 15 minutos. Posteriormente fueron estimuladas con LPS durante 0, 15 y 30 minutos y la reacción

finalizó por centrifugación a 4^o C. A continuación las células fueron fijadas en una laminilla electrocargada e incubadas con DAPI y anti CD14-FITC. Finalmente, se analizó la fluorescencia perinuclear de CD14 mediante microscopía confocal. ANOVA de 1 vía seguida de Bonferroni ***p < 0.001; n=10.

Determinación de la translocación del TLR4 en respuesta al LPS y su sensibilidad a dynasore

Para determinar si en respuesta al LPS ocurre la internalización del receptor TLR4 y si ésta depende de la dinamina, decidimos preincubar a las BMMCs con dynasore o únicamente con medio y posteriormente adicionar LPS durante 0, 15 y 30 minutos, y mediante una microscopía confocal analizar la fluorescencia perinuclear del TLR4.

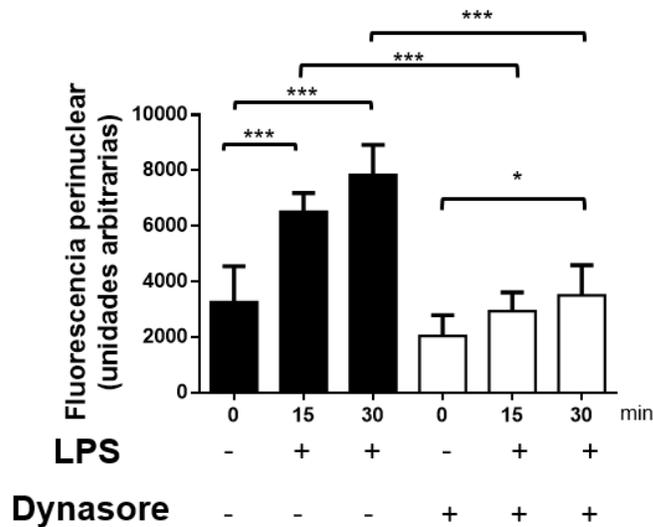
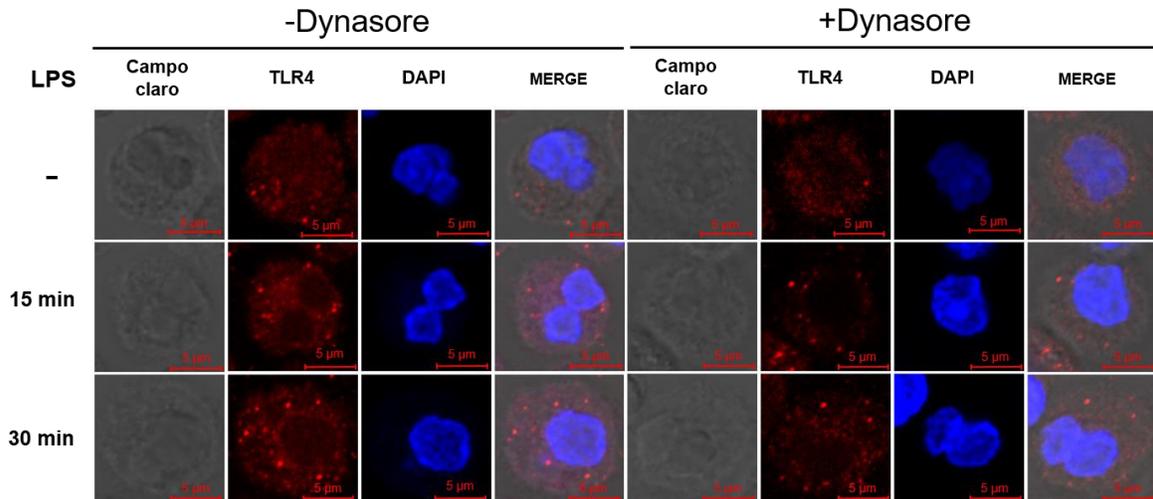


Figura 22. Determinación de la translocación perinuclear del TLR4 en respuesta al LPS y su sensibilidad a dynasore. Un millón de BMMCs fueron preincubadas con dynasore (80 µM) o únicamente en medio de cultivo durante 15 minutos. Posteriormente fueron estimuladas con LPS durante 0, 15

y 30 minutos y la reacción finalizó por centrifugación a 4° C. A continuación las células fueron fijadas en una laminilla electrocargada e incubadas con DAPI y anti TLR4. Finalmente se analizó la fluorescencia perinuclear de TLR4 mediante microscopía confocal. ANOVA de 1 vía seguida de Bonferroni *P < 0.05, ***p < 0.001; n=10.

Determinación de la co-localización del TLR4 y CD14

Para determinar si el receptor TLR4 y CD14 son translocados hacia el mismo compartimento subcelular en respuesta al LPS, decidimos estimular a las BMMCs con LPS durante 0 y 30 minutos y posteriormente observar la fluorescencia del receptor TLR4 y del co-receptor CD14 por microscopía confocal.

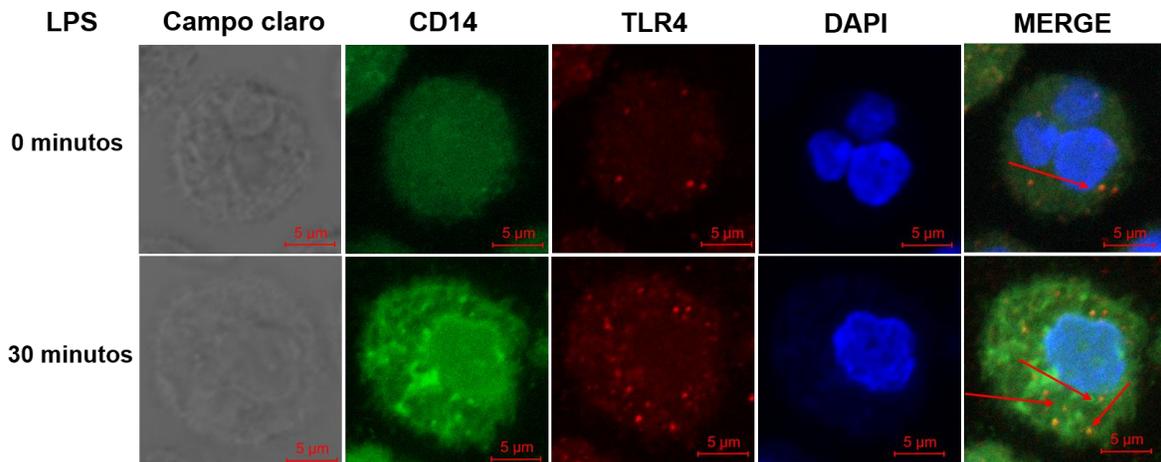


Figura 23. Determinación de la co-localización del TLR4 y CD14 en respuesta al LPS.

Un millón de BMMCs fueron estimuladas durante 0 y 30 minutos con LPS y la reacción finalizó por centrifugación a 4° C. A continuación las células fueron colocadas en una laminilla electrocargada y se incubaron con anticuerpos primarios contra el TLR4 y CD14-FITC. Por microscopía confocal se observó la fluorescencia del TLR4 y CD14-FITC. Las flechas indican las zonas de co-localización del TLR4 y CD14

9. DISCUSIÓN

Curso temporal de la fosforilación de NF- κ B, p38 y ERK 1/2 inducida por LPS

En el presente trabajo se encontró que en células cebadas derivadas de médula ósea que expresan CD14, la estimulación con LPS en un curso temporal de 0 a 4 horas, indujo la fosforilación rápida (a partir de los 15 min) del factor de transcripción NF- κ B y de la cinasa activada por mitogenos p38; ambas alcanzaron una fosforilación máxima a la hora de estimulación. De manera interesante la fosforilación de ERK también se observó a partir de los 15 minutos de estimulación con LPS y se mantuvo activada durante 24 horas. Yamamoto et al, demostraron en fibroblastos pulmonares provenientes de ratones carentes de las proteínas adaptadoras MyD88 y TRIF, que la activación y translocación nuclear del NF- κ B ocurre en dos fases: la fase temprana que sucede en los primeros 30 minutos de estimulación con LPS y es dependiente del adaptador MyD88, y la fase tardía, que corresponde al periodo comprendido entre la primera y segunda horas de estimulación, y es dependiente del adaptador TRIF.

De manera similar Hacker et al, demostraron en macrófagos derivados de médula ósea, provenientes de ratones carentes de las ubiquitin ligasas TRAF6 y TRAF3, que la fase temprana de activación (0, 10 y 30 min) de p38, JNK y ERK inducida por LPS depende de la actividad de TRAF6, mientras que la fase tardía de activación (1-2 horas) depende de la actividad de TRAF3.

Por lo antes mencionado y tomando en cuenta nuestros resultados, podemos sugerir que en BMMCs también existen las 2 fases de activación del NF- κ B y de las MAPK p38 y ERK, y que estas fases podrían ser dependientes de MyD88/TRAF6 (fase temprana) y de TRIF/TRAF3 (fase tardía). Sin embargo, Keck et al reportaron que la activación y translocación tardía (dependiente de TRIF) del NF- κ B, inducida por LPS en BMMCs no existe. Esto se podría explicar porque las BMMCs utilizadas en ese estudio carecían de CD14, un correceptor que es fundamental para inducir la activación de la señalización tardía del TLR4. Por otra parte, es necesario realizar experimentos adicionales en BMMCs provenientes de ratones carentes de MyD88

y TRIF para dilucidar la existencia de los fenómenos de señalización tardía dependientes de TRIF y TRAF3.

La inhibición de la endocitosis dependiente de dinamina interrumpe el sistema de señalización del TLR4

El dynasore es un inhibidor altamente selectivo de la endocitosis dependiente de dinamina. Las BMCC preincubadas con dynasore no mostraron cambios con respecto a las BMCC no expuestas a dynasore en el curso temporal de fosforilación de la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B y de la MAP cinasa p38 en respuesta al LPS. Por el contrario, la pre-incubación con dynasore evitó la fosforilación de la MAP cinasa ERK 1/2 inducida por LPS.

El grupo de trabajo de Jonathan Kagan encontró que al preincubar macrófagos primarios con dynasore se evita la activación del factor de transcripción IRF3, la producción de IFN- β y de la quimiocina CCL5 (todos ellos inducibles por el adaptador TRIF), en respuesta al LPS. En cambio, la activación de la MAP cinasa p38 y la expresión de I κ B (inducibles por el adaptador MyD88) no fueron afectados por la preincubación con dynasore. En el mismo trabajo se demostró que la endocitosis del TLR4 hacia endosomas tempranos, dependiente de dinamina, es necesaria para poder activar a la ubiquitin ligasa TRAF3 por medio del adaptador TRAM.

Además, estudio realizado en la línea celular RAW264.7 demostró que la actividad GTPasa de la dinamina resulta fundamental para permitir la autoubiquitinación en residuos de lisina 63 de TRAF3 en respuesta al LPS (Tseng et al., 2010)

Por lo antes mencionado podemos sugerir que en BMMCs la internalización del TLR4 es necesaria para poder activar a la MAP cinasa ERK, probablemente utilizando a TRAM y a la ubiquitin ligasa TRAF3 como intermediarios del sistema de señalización.

El LPS induce la translocación perinuclear de CD14 y del TLR4

En los experimentos realizados en el presente trabajo observamos que en estado basal las BMMCs presentan inmunoreactividad membranal e intracelular para el co-receptor CD14 y para el TLR4. Sin embargo, frente a un reto con LPS, notamos que ambos receptores se translocan hacia la región perinuclear, de manera dependiente del tiempo de estimulación. En congruencia con nuestros resultados Kagan et al., encontraron que en condiciones basales un pequeño porcentaje del TLR4 se localiza en endosomas tempranos, positivos a Rab5. Además, Tan et al demostraron en macrófagos inmortalizados derivados de médula ósea, que CD14 está endocitado de forma constitutiva y que su endocitosis aumenta en respuesta a la estimulación con LPS y subsecuentemente, CD14 se degrada en lisosomas. También reportaron que el TLR4 se internaliza en respuesta al LPS.

Otro estudio reportó que en monocitos y en células HEK293 la estimulación con LPS induce la internalización del TLR4 hacia la región perinuclear, donde se encuentran los endosomas tempranos positivos a transferrina y posteriormente hacia endosomas tardíos y lisosomas. Los autores proponen que el tráfico vesicular es necesario para desensibilizar al TLR4 (Husebye et al., 2006).

Adicionalmente Husebye et al, utilizando monocitos humanos detectaron la presencia de un pool de TLR4 en el compartimento de reciclamiento endosomal, positivo a Rab11a. Sin embargo, este pool reconoce a bacterias Gram negativas contenidas en los fagosomas y se activa frente a éstas y no ante el LPS soluble.

Es importante resaltar que para que ocurra el fenómeno de internalización del TLR4 en respuesta al LPS es necesaria la expresión de los co-receptores CD14 y MD2. Al igual que CD14, MD2 es un co-receptor fundamental para el reconocimiento del LPS, sin embargo, algunos grupos de trabajo han generado evidencias que indican que, en respuesta al LPS, MD2 selecciona al TLR4 para ser internalizado (Tan et al., 2015; Husebye et al., 2006). CD14 por su parte, es una proteína transmembranal, no integral, que en respuesta al LPS interactúa con receptores transmembranales como son DAP12 y el FcγR, induciendo la activación de la cinasa de la familia SRC SYK y de la PLCγ2 y, de esa manera, permite la

liberación del Ca^{2+} proveniente del retículo endoplásmico liso. Esta cascada de señalización es esencial para la internalización del TLR4 y CD14 hacia la región perinuclear. Por lo anterior podemos concluir que en BMMCs la internalización del TLR4 en respuesta al LPS probablemente sea dependiente de la señalización de MD2 y de CD14.

El dynasore inhibe la translocación perinuclear del TLR4 y de CD14

En BMMCs preincubadas con dynasore la translocación perinuclear de CD14 en respuesta al LPS se abole y, de manera similar, la translocación perinuclear del TLR4 disminuye de forma significativa. Este resultado nos permite afirmar que la actividad GTPasa de la dinamina es importante para la endocitosis de CD14 y TLR4. Evidencias similares fueron reportadas por el grupo de Jonathan Kagan en macrófagos primarios donde la preincubación con dynasore impidió la internalización del TLR4. Otro grupo de trabajo encontró que la internalización del LPS se afecta de forma importante en células HEK293 que expresan la forma dominante negativa de la dinamina (Dyn K44A) y en células HEK293 transfectadas con un siRNA dirigido a clatrina. Esto nos indica, de manera indirecta, que la internalización del TLR4 es dependiente de clatrina y dinamina.

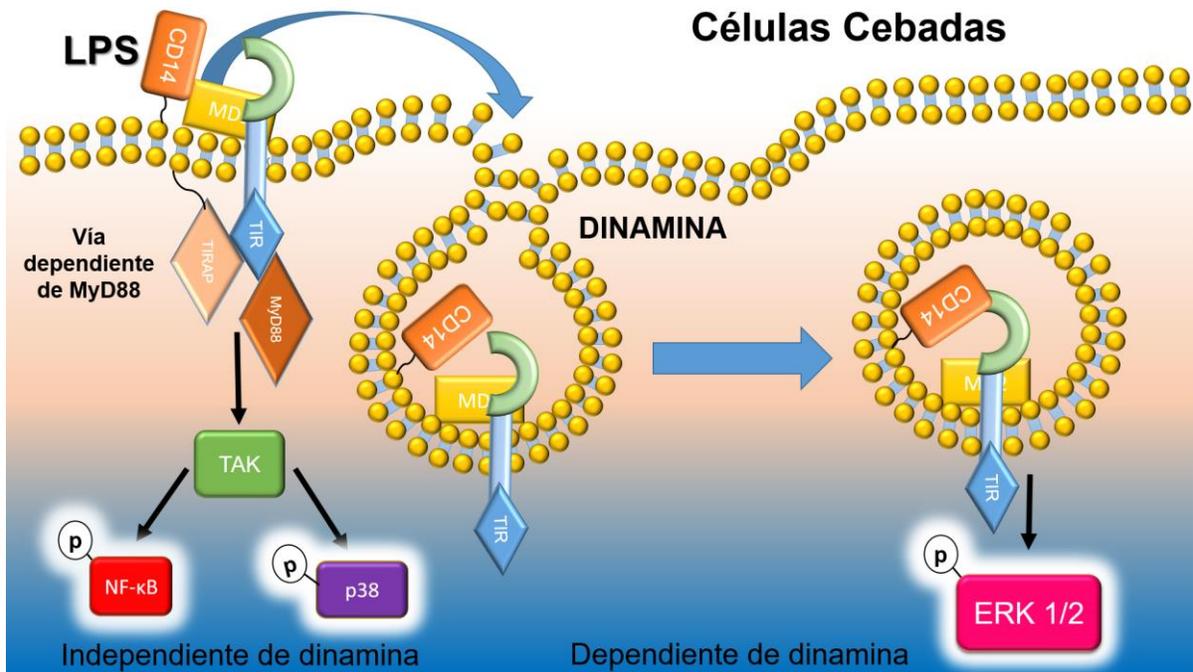


Figura 24. En CC la endocitosis del TLR4 y de CD14 es necesaria para activar a la MAP cinasa ERK 1/2. En BMMCs la activación del TLR4 con LPS desencadena la vía dependiente de MyD88 (independiente de la actividad de la dinamina), que induce la fosforilación rápida de la MAP cinasa p38 y del NF- κ B. Posteriormente, la actividad GTPasa de la dinamina permite la internalización y translocación del TLR4 y CD14 hacia la región perinuclear y este fenómeno está relacionado con la fosforilación de la MAP cinasa ERK 1/2

10. RESUMEN DE RESULTADOS

En BMMCs:

- La activación del TLR4 con LPS durante 4 horas, induce la fosforilación rápida del NF- κ B (15 minutos), la cual alcanza una intensidad máxima a los 60 minutos de estimulación.
- La activación del TLR4 con LPS durante 4 horas, induce la fosforilación rápida de la MAP cinasa p38 (a partir de los 15 minutos) alcanzando una intensidad máxima a los 60 minutos de estimulación.
- La activación del TLR4 con LPS durante 4 horas, induce la activación rápida de la MAP cinasa ERK, la cual se mantiene durante todo el curso temporal.
- La preincubación de las BMMCs con dynasore no modifica la fosforilación del NF- κ B inducida por LPS.
- La preincubación de las BMMCs con dynasore no modifica la fosforilación de la MAP cinasa p38 inducida por LPS.
- La preincubación de las BMMCs con dynasore evita la fosforilación de la MAP cinasa ERK 1/2 inducida por LPS.
- La estimulación con LPS induce la translocación perinuclear de CD14.
- La estimulación con LPS induce la translocación perinuclear del TLR4.
- En respuesta al LPS el TLR4 y CD14 co-localizan en la región perinuclear.
- La preincubación de las BMMCs con dynasore impide la translocación perinuclear de CD14 inducida por LPS
- La preincubación de las BMMCs con dynasore impide la translocación perinuclear del TLR4 inducida por LPS

11. CONCLUSIONES

En BMMCs sensibilizadas con IgE existe una vía de señalización intracelular del receptor TLR4 que lleva a la fosforilación de ERK 1/2. Esta vía es dependiente de la actividad de dinamina y su función está relacionada con la movilización del TLR4 y del co-receptor CD14 hacia la región perinuclear

12.PERSPECTIVAS

1. Determinar si la producción y secreción de citocinas pro-inflamatorias inducidas por la activación del TLR4 dependen de la actividad de la dinamina
2. Determinar si TRAF3 y TRAF6 requieren de la endocitosis dependiente de dinamina para activarse
3. Determinar si el TLR4 y CD14 son movilizados hacia endosomas tempranos en respuesta al LPS
4. Determinar si CD14 activa sistemas de señalización de forma independiente del TLR4.

13. |ANEXO I

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Preparación del medio RPMI

RPMI medio wo/glutamina (Biofluidos P102-500)	500 mL
Penicilina-Estreptomicina-Glutamina (Gibco BRL 10378-016)	6 mL
Hepes buffer 1M (Gibco BRL 15630-080)	12.5 mL
NEAA 100X (Biofluidos 333-100)	5 mL
β -Mercaptoetanol (Sigma M7522)	175 mL
Suero fetal bovino 100% (Sigma)	100 mL
IL-3 (Prepro Tech)	20 ng/mL

El pH del medio de cultivo se ajustó a 7.4, y se pasó a través de una unidad de filtración con una membrana de 0.22 micras y se recolecto en un frasco estéril. Se mantuvo en refrigeración a 4° C

Preparación de PBS 1X

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

Todos los reactivos utilizados fueron de SIGMA. Los componentes fueron disueltos en 800 mL de agua destilada y el pH se ajustó a 7.4, posteriormente se aforo a 1000 mL con agua destilada

Preparación de TBS-T

Tris	6.0 g
NaCl	9.0 g
Tween 20	0.5 mL

Todos los reactivos utilizados fueron de SIGMA. Los componentes fueron disueltos en 1 litro de agua mili Q, y el pH se ajustó a 7.5

Referencia bibliográfica

1. Arthur, J. S. C., & Ley, S. C. (2013). Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(9), 679-692.
2. Cardamone, C., Parente, R., De Feo, G., & Triggiani, M. (2016). Mast cells as effector cells of innate immunity and regulators of adaptive immunity. *Immunology Letters*, 178, 10-14.
3. Chan, C. Y., John, A. L. S., & Abraham, S. N. (2013). Mast cell interleukin-10 drives localized tolerance in chronic bladder infection. *Immunity*, 38(2), 349-359.
4. Chuang, T. H., & Ulevitch, R. J. (2004). Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nature immunology*, 5(5), 495-502.
5. Cohen, J. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420(6917), 885-891.
6. Da Silva, E. Z. M., Jamur, M. C., & Oliver, C. (2014). Mast Cell Function A New Vision of an Old Cell. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 62(10), 698-738.
7. de Miranda, S. M. N., Wilhelm, T., Huber, M., & Zorn, C. N. (2016). Differential Lyn-dependence of the SHIP1-deficient mast cell phenotype. *Cell Communication and Signaling*, 14(1), 12.
8. Feng, B. S., S. H. He, P. Y. Zheng, L. Wu, and P. C. Yang. 2007. Mast cells play a crucial role in *Staphylococcus aureus* peptidoglycan-induced diarrhea. *Am. J. Pathol.* 171: 537–547.
9. Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T. & Maniatis, T. (2003). IKK ϵ and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nature immunology*, 4(5), 491-496.
10. Galanos, C., Lüderitz, O., Rietschel, E. T., Westphal, O., Brade, H., Brade, L. & Kusumoto, S. (1985). Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *The FEBS Journal*, 148(1), 1-5.
11. Gurish, M. F., & Austen, K. F. (2012). Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. *Immunity*, 37(1), 25-33.

12. Häcker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L. C., Wang, G. G. & Mann, M. (2006). Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature*, 439(7073), 204-207.
13. Hajjar, A. M., Ernst, R. K., Tsai, J. H., Wilson, C. B., & Miller, S. I. (2002). Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nature immunology*, 3(4), 354-359.
14. Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., ... & Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *The Journal of Immunology*, 162(7), 3749-3752.
15. Husebye, H., Aune, M. H., Stenvik, J., Samstad, E., Skjeldal, F., Halaas, Ø., & Mollnes, T. E. (2010). The Rab11a GTPase controls Toll-like receptor 4-induced activation of interferon regulatory factor-3 on phagosomes. *Immunity*, 33(4), 583-596.
16. Husebye, H., Halaas, Ø., Stenmark, H., Tunheim, G., Sandanger, Ø., Bogen, B. & Espevik, T. (2006). Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *The EMBO journal*, 25(4), 683-692.
17. Jiang, Z., Georgel, P., Du, X., Shamel, L., Sovath, S., Mudd, S. & Freudenberg, M. (2005). CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nature immunology*, 6(6), 565-570
18. John, A. L. S., & Abraham, S. N. (2013). Innate immunity and its regulation by mast cells. *The Journal of Immunology*, 190(9), 4458-4463.)
19. Kagan, J. C., & Medzhitov, R. (2006). Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell*, 125(5), 943-955
20. Kagan, J. C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., & Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon- β . *Nature immunology*, 9(4), 361-368.
21. Kalesnikoff, J., Huber, M., Lam, V., Damen, J. E., Zhang, J., Siraganian, R. P., & Krystal, G. (2001). Monomeric IgE stimulates signaling pathways in mast

- cells that lead to cytokine production and cell survival. *Immunity*, 14(6), 801-811.
22. Kawai, T., and S. Akira. 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34: 637–650
 23. Keck, S., Müller, I., Fejer, G., Savic, I., Tchaptchet, S., Nielsen, P. J. & Freudenberg, M. A. (2011). Absence of TRIF signaling in lipopolysaccharide-stimulated murine mast cells. *The journal of immunology*, 186(9), 5478-5488.
 24. Kraft, S., & Kinet, J. P. (2007). New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 7(5), 365-378.
 25. Kulka, M., L. Alexopoulou, R. A. Flavell, and D. D. Metcalfe. 2004. Activation of mast cells by double-stranded RNA: evidence for activation through Toll-like receptor 3. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114: 174–182.
 26. Kusumoto, S., Fukase, K., Fukase, Y., Kataoka, M., Yoshizaki, H., Sato, K., & Suda, Y. (2003). Structural basis for endotoxic and antagonistic activities: investigation with novel synthetic lipid A analogs. *Journal of endotoxin research*, 9(6), 361-366.
 27. Lee, C. C., Avalos, A. M., & Ploegh, H. L. (2012). Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nature Reviews Immunology*, 12(3), 168-179.
 28. Leveson-Gower, D. B., Segal, E. I., Kalesnikoff, J., Florek, M., Pan, Y., Pierini, A. & Negrin, R. S. (2013). Mast cells suppress murine GVHD in a mechanism independent of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Blood*, 122(22), 3659-3665.
 29. Malveaux, F. J., Conroy, M. C., Adkinson Jr, N. F., & Lichtenstein, L. M. (1978). IgE receptors on human basophils. Relationship to serum IgE concentration. *Journal of Clinical Investigation*, 62(1), 176.
 30. Mata-Haro, V., Cekic, C., Martin, M., Chilton, P. M., Casella, C. R., & Mitchell, T. C. (2007). The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science*, 316(5831), 1628-1632.
 31. Maurer, D., Fiebiger, E., Reininger, B., Wolff-Winiski, B., Jouvin, M. H., Kilgus, O. & Stingl, G. (1994). Expression of functional high affinity immunoglobulin

- E receptors (Fc epsilon RI) on monocytes of atopic individuals. *Journal of Experimental Medicine*, 179(2), 745-750.
32. McCurdy, J. D., T. J. Olynych, L. H. Maher, and J. S. Marshall. 2003. Cutting edge: distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J. Immunol.* 170: 1625–1629.
 33. Medina-Tamayo, J., Ibarra-Sánchez, A., Padilla-Trejo, A., & González-Espinosa, C. (2011). IgE-dependent sensitization increases responsiveness to LPS but does not modify development of endotoxin tolerance in mast cells. *Inflammation Research*, 60(1), 19-27.
 34. Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S. & Miyake, K. (2002). Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nature immunology*, 3(7), 667-672.
 35. Pandey, S., Kawai, T., & Akira, S. (2015). Microbial sensing by toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(1), a016246
 36. Raetz, C. R., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual review of biochemistry*, 71(1), 635-700.
 37. Saitoh, S. I. (2009). Chaperones and transport proteins regulate TLR4 trafficking and activation. *Immunobiology*, 214(7), 594-600.
 38. Schromm, A. B., Brandenburg, K., Loppnow, H., Moran, A. P., Koch, M. H., Rietschel, E. T., & Seydel, U. (2000). Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *The FEBS Journal*, 267(7), 2008-2013.
 39. Schromm, A. B., Brandenburg, K., Loppnow, H., Zähringer, U., Rietschel, E. T., Carroll, S. F. & Seydel, U. (1998). The charge of endotoxin molecules influences their conformation and IL-6-inducing capacity. *The Journal of Immunology*, 161(10), 5464-5471.
 40. Sharma, S., Grandvaux, N., Zhou, G. P., Lin, R., & Hiscott, J. (2003). Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science*, 300(5622), 1148-1151.

41. Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., & Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *Journal of Experimental Medicine*, 189(11), 1777-1782.
42. Sihra, B. S., Kon, O. M., Grant, J. A., & Kay, A. B. (1997). Expression of high-affinity IgE receptors (FcεRI) on peripheral blood basophils, monocytes, and eosinophils in atopic and nonatopic subjects: Relationship to total serum IgE concentrations. *Journal of allergy and clinical immunology*, 99(5), 699-706.
43. Tan, Y., Zanoni, I., Cullen, T. W., Goodman, A. L., & Kagan, J. C. (2015). Mechanisms of toll-like receptor 4 endocytosis reveal a common immune-evasion strategy used by pathogenic and commensal bacteria. *Immunity*, 43(5), 909-922.
44. Tancowny, B. P., V. Karpov, R. P. Schleimer, and M. Kulka. 2010. Substance P primes lipoteichoic acid- and Pam3CysSerLys4-mediated activation of human mast cells by up-regulating Toll-like receptor 2. *Immunology* 131: 220–230.
45. Tseng, P. H., Matsuzawa, A., Zhang, W., Mino, T., Vignali, D. A., & Karin, M. (2010). Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. *Nature immunology*, 11(1), 70-75.
46. Wakabayashi, Y., Kobayashi, M., Akashi-Takamura, S., Tanimura, N., Konno, K., Takahashi, K. & Takaki, S. (2006). A protein associated with toll-like receptor 4 (PRAT4A) regulates cell surface expression of TLR4. *The Journal of Immunology*, 177(3), 1772-1779.
47. Yamamoto, M., & Akira, S. (2004). TIR domain--containing adaptors regulate TLR-mediated signaling pathways. *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine*, 62(12), 2197-2203.
48. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H. & Akira, S. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 301(5633), 640-643.

49. Yang, Y., Liu, B., Dai, J., Srivastava, P. K., Zammit, D. J., Lefrançois, L., & Li, Z. (2007). Heat shock protein gp96 is a master chaperone for toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages. *Immunity*, 26(2), 215-226.
50. Zanoni, I., Ostuni, R., Marek, L. R., Barresi, S., Barbalat, R., Barton, G. M., Kagan, J. C. (2011). CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like Receptor 4. *Cell*, 147(4), 868–880.

EL JURADO DESIGNADO POR EL DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGIA UNIDAD COAPA,
DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITECNICO NACIONAL, APRUEBA LA TESIS:

**“Caracterización de las posibles vías de señalización intracelular activadas por LPS en
células cebadas”**

QUE PRESENTA EL C. ABRAHAM ROMAN FIGUEROA PARA SU EXAMEN FINAL DE MAESTRIA
EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE NEUROFARMACOLOGIA Y TERAPEUTICA
EXPERIMENTAL, EL DIA 11 DE AGOSTO DEL 2017.

Dra. Claudia González Espinosa
Investigador Cinvestav 3D

Dra. Gabriela Rodríguez Manzo
Investigador Cinvestav 3C

Dra. Erika Rendón Huerta
Investigador PRIDE C

