



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITECNICO NACIONAL

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**Vías de señalización activadas por el lipopolisacárido bacteriano
en células cebadas carentes del receptor Toll-like 4**

Tesis que presenta:

Biol. Nancy Sánchez Fuentes

Para Obtener el Grado de:

Maestra en Ciencias en Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directora de la Tesis:

Dra. Claudia González Espinosa

Ciudad de México

Agosto, 2019

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio No. 11 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, a cargo de la Dra. Claudia González Espinosa. Se realizó con el apoyo de la Beca de Maestría del Conacyt No. 165305 para NSF y el Proyecto Conacyt FC 1122 para CGE.

Dedicada a mis grandes tesoros, mi esposo y mi hija, Oscar siempre has estado a mi lado en las buenas y en las malas, siempre creíste en mí, me ayudaste a cumplir mis metas y sueños, este trabajo de maestría sacrificó mucho tiempo de familia y te agradezco que tomarás el papel de papá, mamá, amigo y esposo de tiempo completo.

Yaretzi te agradezco que a pesar de ser pequeña supiste entender cuando estudiaba o llegaba tarde y no podía jugar contigo, eres un motor que hace que yo siga adelante, aunque no sea fácil. Soy muy afortunada de contar con ustedes, mis grandes tesoros, los amo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dr. Claudia González Espinosa, por aceptarme en su laboratorio y dirigir mi proyecto de tesis.

A mis sinodales, la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo y el Dr. Genaro Vázquez Victorio, por aceptar formar parte de mi comité, así como por sus comentarios y aportaciones al proyecto.

Al M. en C. Alfredo Ibarra Sánchez. Auxiliar de Investigación, por la generación de las BMMCs, la caracterización inicial de las células provenientes de ratones TLR4^{-/-} y por la asesoría en todas las técnicas *in vitro* utilizadas en la tesis.

Al Dr. Jorge Fernández, Ricardo Glaxiola Centeno, Víctor Manuel García Gómez, Benjamín E. Chávez Álvarez, María Antonieta López López y Ramón Gómez Martínez de la Unidad de Producción y Uso Experimental de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Cinvestav, Unidad Zacatenco, por la generación y mantenimiento de las colonias de animales WT y TLR4^{-/-} utilizados en la tesis.

A mis Compañeros de generación, por ayudarme cuando no entendía los temas de clases y por el apoyo moral, para continuar y terminar.

A mis compañeros del laboratorio 11.

A mis papás, hermanos, primos y amigos, pero especialmente a mi mamá, por creer en mí y apoyarme siempre en todos los aspectos, a mi hermano Asai, por llevarme al CINVESTAV y motivarme a continuar con los estudios.

Oscar Sevilla, por apoyarme siempre, por cuidar y estar al pendiente de Yaretzi, por tus palabras de aliento cuando sentía que no podía seguir, por creer que sí lo lograría.

Yaretzi, por motivarme a seguir adelante y terminar.

ÍNDICE

Índice de figuras.....	iii
Tabla de abreviaturas.....	v
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
La inmunidad innata.....	1
Inflamación.....	1
Las células participantes en la inmunidad innata.....	2
Las células cebadas.....	6
Sensibilización y activación a través del receptor FcεR1.....	8
Receptores de la inmunidad innata.....	9
Células cebadas en la inmunidad innata.....	14
El TLR4 y su sistema de señalización.....	15
El lipopolisácarido.....	16
Señalización de la vía dependiente de MyD88.....	18
Señalización de la vía dependiente de TRIF.....	20
Vía de señalización no canónica.....	22
ANTECEDENTES.....	24
JUSTIFICACIÓN.....	27
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVO GENERAL.....	28
Objetivos particulares.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
Anticuerpos.....	29
Reactivos.....	30
Ratones y genotificación.....	30
Obtención de BMMCs.....	31

Estimulación de BMMCs y TLR4 ^{-/-} con LPS	32
Western blot.....	32
RT-PCR punto final.....	33
Lavados peritoneales.....	35
Análisis de estadístico.....	35
RESULTADOS	36
Resumen de resultados.....	47
DISCUSIÓN	48
1. Las citocinas que se inducen con LPS en WT.....	48
2. Las citocinas que no se indujeron igual.....	50
3. Activación de las MAPKs.....	53
4. Vías Activadas por el LPS, Independientes del TLR4.....	53
CONCLUSIÓN	57
PERSPECTIVAS	57
REFERENCIAS	58
ANEXO 1	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Célula dendrítica, procesamiento antigénico.....	5
Figura 2. Origen de las células cebadas.....	6
Figura 3. Célula cebadas.....	7
Figura 4. Entrecruzamiento del FcεRI.....	8
Figura 5. Sensibilización de células cebadas.....	9
Figura 6. Receptores de reconocimiento de patrones (PRR) en células cebadas...10	
Figura 7. Receptores NOD.....	11
Figura 8. Receptores RLR.....	13
Figura 9. Estructura del receptor Toll-like 4.....	16
Figura 10. Estructura del Lipopolisácarido (LPS).....	17
Figura 11. Mecanismos de reconocimiento del LPS.	18
Figura 12. Vías de señalización canónicas activadas por el receptor TLR4	19
Figura 13. Estabilización del mRNA.....	20
Figura 14. Mecanismo de acción de la dinamina.....	21
Figura 15. Vía de señalización no canónica.....	23
Figura 16. Inmunolocalización del receptor TLR4 y CD14 en BMMCs.....	24
Figura 17. Localización de CD14 en respuesta a un estímulo con LPS y su sensibilidad a dynasore.....	25
Figura 18. Localización del TLR4 en respuesta a un estímulo con LPS y su sensibilidad a dynasore.....	26
Figura 19. Genotificación de ratones TLR4.....	31
Figura 20. Expresión del TLR4 por RT-PCR punto final.....	35
Figura 21. Inducción de la expresión del mRNA de TNF-α por LPS en ausencia del receptor TLR4.....	38
Figura 22. Inducción de la expresión del mRNA de IL-6 por LPS en ausencia del receptor TLR4.....	39

Figura 23. Expresión del mRNA de CCL2 por LPS en ausencia del receptor TLR4.....	40
Figura 24. Inducción de la expresión del mRNA de IL-4 por LPS en ausencia del receptor TLR4.....	41
Figura 25. Ausencia de la expresión del mRNA de IL-2 por LPS en BMMCs.....	42
Figura 26. Ausencia de la expresión del mRNA de INF- β por LPS en ausencia del TLR4.....	43
Figura 27. Fosforilación de p38 por LPS en ausencia del receptor TLR4.....	44
Figura 28. Inducción de la fosforilación de ERK por LPS en ausencia del receptor TLR4.....	45
Figura 29. Fosforilación de PKC- α por LPS en BMMCs.....	46
Figura 30. Vías de señalización activadas en ausencia del receptor TLR4.....	56

TABLA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Nombre en inglés	Nombre en español
AP-1	Activator protein 1	Proteína activadora
CARD	Caspase activation and recruitment domains	Dominio reclutador de activación de caspasas
CCs	Mast cell	Células cebadas
CD14	Cluster of differentiation 14	Cluster de diferenciación 14
BMMCs	Bone marrow derived <i>mast cells</i>	Células cebadas derivadas de la médula ósea
CN	<i>Calcineurin</i>	Calcineurina
CREB	cAMP response element binding	Elemento modulador de respuesta a cAMP
DAG	diacylglycerol	Diacilglicerol
DAMPs	Damage associated molecular patterns	Patrones moleculares asociados a daño
ERK	Extracellular signal regulated kinases	Cinasa regulada por una señal externa
FADD	Fas associated protein with death <i>domain</i>	Dominio de muerte asociado a la proteína Fas
fAR1	Folic acid receptor 1	Receptor para ácido fólico
FcεRI	High-affinity IgE receptor	Receptor de alta afinidad para la IgE
GPI	<i>Glycosyl</i> -phosphatidylinositol	Glicosilfosfatidilinositol
IFN	Interferons	Interferón
IκB	NF-κB inhibitor	Inhibidor del factor nuclear Kb
IKK	IκB kinase	Cinasa IκB

IL	Interleukin	Interleucina
IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphate	Inositol 1,4,5-trisfosfato
IRAK	The interleukin-1 receptor associated <i>kinase</i>	Cinasas asociadas con el receptor de IL-1
JNK	c-jun N-terminal <i>kinase</i>	Cinasas c-Jun N-terminal
KO	<i>Knockout</i>	<i>Knockout</i>
LBP	Lipopolysaccharide binding <i>protein</i>	Proteína de unión al lipopolisacárido bacteriano
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolisacárido bacteriano
MAPK	Mitogen-activated protein <i>kinase</i>	Proteína cinasa activada por mitógeno
MD2	<i>Myeloid differentiation factor-2</i>	Factor de diferenciación mieloide
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>	Complejo mayor de histocompatibilidad
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88	Factor de diferenciación mieloide 88
NFAT	Nuclear factor of activated T cells	Factor nuclear de activación de células T
NF- κ B	Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells	Factor nuclear kappa B
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns	Patrones moleculares asociados a patógenos
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate	Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato
PKC	<i>Protein kinase C</i>	Proteína cinasa C
PLC	Phospholipase C	fosfolipasa C

PRRs	Pattern recognition receptors pattern recognition receptors	Receptores de reconocimiento de patrones
NOD	Nucleotide-binding and oligomerization domain	Dominio de oligomerización unido a nucleótidos
RIP1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1	Proteína cinasa 1 serina/treonina de interacción con el receptor
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>	Factor de células madre
TLR	<i>Toll-like receptor</i>	Receptores tipo Toll
TNF	El factor de necrosis tumoral	Factor de necrosis tumoral
TRADD	TNF receptor associated death domain	Dominio de muerte asociado a TNF
TRAF	The tumor necrosis factor receptor associated factor	Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
WT	Wild type	Cepa silvestre
RIG-1	retinoic acid-inducible gene 1	Gen inducible por ácido retinoico I
MAVS	Mitochondrial antiviral- signaling protein	Proteína de señalización antiviral mitocondrial
MYD88	Myeloid differentiation primary response 88	respuesta primaria de diferenciación mieloides 88
TRIF	TIR-domain containing adapter inducing interferon β	factor inductor de interferón que contiene el dominio TIR
TTP	Tristetraprolin	Tristetraprolinas
poli-A	Polyadenine tail	Cola de poliadeninas
ARE	Adenylate uridylate rich elements	Elementos ricos en adenina y uracilo

RESUMEN

Las células cebadas (CCs) forman parte del sistema inmune innato. Se caracterizan por presentar una gran cantidad de gránulos secretores, los cuales tienen mediadores inflamatorios preformados (Frossi *et al.*, 2017). También tienen diversos receptores en la superficie de su membrana y en su interior. Uno de los receptores de superficie expresados en las CCs es el Toll-like 4 (TLR4). El TLR4 tiene un co-receptor denominado CD14, que reconoce al lipopolisacárido bacteriano (LPS). El LPS es una molécula que forma parte de la pared celular de las bacterias Gram negativas. CD14 reconoce al LPS y lo presenta al TLR4. Una vez unido el LPS al TLR4 se inician cascadas señalización, que inducen la síntesis y liberación de citocinas pro-inflamatorias.

Hasta el momento se sabe que el LPS induce síntesis de citocinas pro-inflamatorias a través del receptor TLR4, sin embargo, Zanoni y Granucci (2013) encontraron que, en células dendríticas, el LPS activa una vía no canónica en ausencia del TLR4 y es CD14 quien la desencadena. Esto nos hace pensar que puede haber vías que son activadas por el LPS en ausencia del TLR4. En este trabajo nosotros usamos CCs derivadas de médula ósea de ratones TLR4^{-/-} y encontramos que el LPS es capaz de activar vías de señalización canónicas que llevan a la síntesis de citocinas, indicando que ese tipo celular tiene mecanismos alternos para responder al LPS y abriendo la puerta para realizar más estudios encaminados a averiguar cuál molécula es la responsable de la activación de tales vías de señalización.

ABSTRACT

Mast cells (MCs) are part of the innate immune system. They are characterized by the presence of multiple secretory granules that contain pre-formed inflammatory mediators (Frossi, *et al.*, 2017). MCs also express a number of different receptors in intracellular locations and their plasma membrane. One of most important receptors expressed on MCs is Toll-like receptor 4 (TLR4). This receptor signals utilizing the co-receptor CD14 that recognizes lipopolysaccharide (LPS), an important component of the Gram-negative bacteria cell wall. CD14 recognizes LPS and present it to the TLR4 receptor. Once bound to TLR4, distinct signaling cascades are activated, leading to the synthesis and release of pro-inflammatory cytokines.

Although it is known that LPS leads to cytokine mRNA expression through TLR4, Zanoni and Granucci (2013) found that in dendritic cells, LPS activates a CD-14-dependent, non-canonical signaling pathway in the absence of TLR4. Those results lead us to ask if in MCs those alternative pathways activated by LPS could exist. In the present work, we utilized MCs derived from bone marrow of TLR4^{-/-} mice and found that LPS activates signaling cascades leading to the synthesis of pro-inflammatory cytokines, indicating that this cellular type posses alternative mechanism to respond to LPS and open new avenues on the research on the specific molecule(s) responsible for those signaling pathways.

INTRODUCCIÓN

La Inmunidad Innata

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra las infecciones y el daño tisular. Entre sus funciones se encuentran la reparación de tejidos dañados e impedir la entrada de microorganismos patógenos, controlando su avance y eliminándolos mediante distintas reacciones (estallido respiratorio, fagocitosis y secreción de mediadores), así como a través de la activación de las respuestas inmunitarias adaptativas (Abbas *et al.*, 2015). Aunque existe evidencia reciente que indica que la memoria inmunológica de la inmunidad innata depende de mecanismos epigenéticos que modifican las respuestas de poblaciones celulares de acuerdo a estímulos percibidos con anterioridad, (Netea *et al.*, 2016) se ha observado que, en respuesta a exposiciones repetidas a una molécula o agente extraño, se observan reacciones inflamatorias iniciales que siguen patrones muy similares (Corridoni y Simmons, 2017). Por otro lado, aunque a la inmunidad innata se le considera inespecífica, algunos de sus elementos son capaces de discriminar lo propio de lo ajeno y actúan de forma rápida. Las respuestas se producen en minutos u horas y su intensidad no parece estar ligada estrictamente a un contacto previo con el agente extraño (Tsukamoto *et al.*, 2018).

Inflamación

La inflamación es un fenómeno fisiológico caracterizado por el reclutamiento de leucocitos y la infiltración de proteínas plasmáticas a los lugares de infección o lesión tisular. La inflamación se desencadena por el reconocimiento de microbios y tejidos muertos en la respuesta inmune innata y puede prolongarse por un tiempo largo mediante mecanismos de la respuesta inmune adaptativa (Abbas *et al.*, 2015). A nivel tisular, la primera etapa del proceso inflamatorio consiste en la activación de las células inmunes residentes en los tejidos por componentes de los agentes extraños o las células dañadas y la producción de mediadores inflamatorios que activan al endotelio vascular. El endotelio activado permite el paso de líquido y células circulantes al sitio de la lesión, llevando a la formación de edema y a la manifestación de otros signos de

la inflamación. El incremento en la presión intersticial debido al edema obliga a algunos de los fluidos a entrar en los capilares linfáticos, favoreciendo la entrada de antígenos libres al interior de tales vasos. Ese transporte de grandes cantidades de antígenos lleva a la activación eficiente de la respuesta inmune adaptativa (Hung *et al.*, 2016). El proceso inflamatorio es benéfico sólo si está regulado, ya que de lo contrario el tejido del hospedero puede ser seriamente dañado por las células reclutadas y los mediadores inflamatorios. Si la inflamación no se limita, se convierte en un fenómeno crónico y la inflamación crónica es un importante factor asociado a múltiples enfermedades autoinmunes como la aterosclerosis, las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer. Los mecanismos fisiológicos de control negativo de la inflamación incluyen la producción de lípidos y citocinas antiinflamatorias. Estas sustancias inducen la reparación tisular y la activación de factores de transcripción, como el NFAT (Factor Nuclear Activador de Células T) o el NF- κ B (Factor Nuclear Kappa B) que participan en la expresión de varias proteínas inhibitoras. Por otro lado, el NFAT puede unirse al promotor de la interleucina 2 (IL-2), así como al promotor de TNF- α , para inducir la síntesis de dichas citocinas (Tsytsykova y Goldfeld, 2002; Falvo *et al.*, 2010). El factor de transcripción NF- κ B también tiene un sitio de unión en el promotor de TNF- α . Una vez unido el NF- κ B al promotor de TNF- α comienza la producción de la citocina TNF- α .

Las Células Participantes en la Inmunidad Innata

Las células participantes en la inmunidad innata son fagocíticas, polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), fagocíticas mononucleares (macrófagos y células dendríticas), células asesinas naturales (NK) y células cebadas (Abbas *et al.*, 2015). A continuación, se presenta una descripción breve de cada uno de esos tipos celulares.

Macrófagos. Se derivan de precursores (CD34⁺, CD38⁺) en médula ósea y cuando maduran, se sitúan en lugares de exposición primaria de patógenos, como la mucosa intestinal y las vías aéreas. Los macrófagos son cruciales para el inicio de la respuesta inflamatoria, ya que se activan por moléculas producidas por patógenos y por tejidos

dañados. Al activarse, los macrófagos fagocitan agentes patógenos y tejidos dañados, produciendo quimiocinas que reclutan a monocitos y neutrófilos al sitio de la infección. Los macrófagos están asociados con la respuesta a diferentes grupos de patógenos. Dependiendo de sus funciones especializadas, los macrófagos se dividen en dos grupos, llamados M1 y M2 (Huang *et al.*, 2017). Los M1 cuya principal función es la fagocitosis, se consideran proinflamatorios y secretan TNF- α , IL-1 β , IL-12, que promueven la generación de linfocitos cooperadores Th1, especies reactivas de oxígeno y derivadas de óxido nítrico, para destruir bacterias o células tumorales. Por su parte, los macrófagos M2 secretan interleucinas antiinflamatorias como la IL-10, IL-13, Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y promueven regeneración de tejidos y angiogénesis (Liu *et al.*, 2019; Rivera *et al.*, 2016; Ferraro *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2017).

Neutrófilos. Presentan núcleo multilobular, gránulos que contienen enzimas antimicrobianas, como mieloperoxidasa, lisozima, elastasa y colagensa, entre otras. Los neutrófilos son de las primeras células que aparecen en infecciones bacterianas (Gartner y Hiatt, 2008).

Los neutrófilos reclutan células del sistema inmune en el tejido infectado mediante un mecanismo similar al de los macrófagos, ya que involucra la producción de quimiocinas que atraen a otras células hacia donde se localizan (Giese *et al.*, 2019).

Los neutrófilos son una fuente importante de citocinas y quimiocinas que activan y reclutan a otras células del sistema inmune. Estas células también se pueden polarizar en N1 o N2 con diferentes capacidades de producción de citocinas. Por ejemplo, los neutrófilos N1 expresan un fenotipo pro-inflamatorio y antitumoral, mientras que los neutrófilos N2 promueven la angiogénesis y un estado de supresión del sistema inmune (Wu *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2017).

Basófilos. Tienen gránulos grandes que contienen histamina, heparina y ácido hialurónico principalmente. Estas moléculas se liberan durante las reacciones

alérgicas. Los basófilos son muy parecidos a las células cebadas, debido al contenido granular y a los receptores de superficie celular (Kubo, 2018; Jensen *et al.*, 2014). Se encuentran en sangre en bajas concentraciones y proliferan cuando se presentan infecciones parasitarias por garrapatas o helmintos (lombrices, gusanos, solitaria). Además, los basófilos producen IL-4, la cual, al interactuar con macrófagos residentes de la piel, promueve el fenotipo M2 (Eberle y Voehringer, 2016; Chirumbelo *et al.*, 2018; Ashley y Soman, 2013).

Eosinófilos. Son granulocitos circulantes que intervienen en infecciones parasitarias, reacciones alérgicas y asma. Una vez activados, desgranulan rápidamente y liberan factores que promueven la coagulación y agregación plaquetaria (Navarro *et al.*, 2018). También pueden liberar histaminasa, enzima que hidroliza a la histamina y de esta forma regula las reacciones inmunológicas (Pease y Williams 2018; Ullmann *et al.*, 2013).

Células dendríticas. Se forman en médula ósea y migran hacia diferentes tejidos como la piel y mucosas del sistema respiratorio y gastrointestinal. Son centinelas del sistema inmune, una vez que reconocen un patógeno, las células dendríticas se activan, maduran y liberan diferentes citocinas proinflamatorias para defender al huésped. Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno profesionales, para ello fagocitan patógenos o antígenos, los degradan, y los unen al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), para ser expuestos en su superficie (Figura 1). Así es como presentan los antígenos a los linfocitos T. Si los antígenos no están unidos al MHC los linfocitos T no los pueden reconocer (Steinman y Banchereau, 2007). Los linfocitos T son activados cuando reconocen al antígeno mediante células presentadoras de antígenos (Steinman y Witmer 1978).

Las células dendríticas son las células presentadoras de antígenos más potentes del organismo, también pueden interactuar con los linfocitos B, estimulando su activación y su diferenciación en linfocitos B plasmacitoides, esto es en células productoras de anticuerpos (Lipscomb y Masten, 2002; Weber *et al.* 2015).

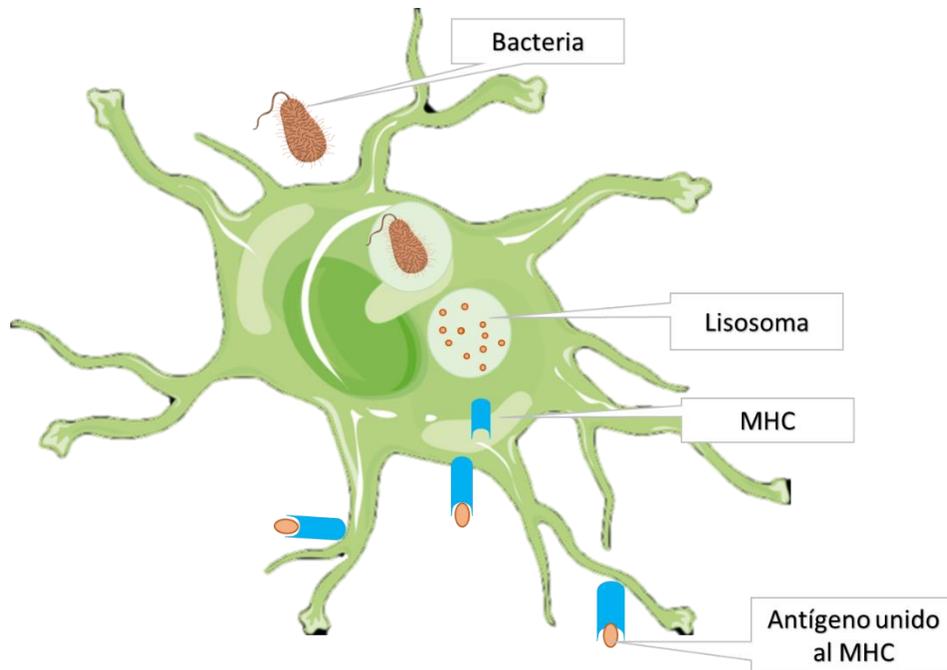


Figura 1. Célula dendrítica y procesamiento antigénico. Las células dendríticas reconocen patógenos y los fagocitan, posteriormente son llevados al lisosoma, para su degradación. Los antígenos resultantes de la degradación del patógeno son colocados en el MHC y son expuestos en la superficie de la célula dendrítica, para presentarlos a los linfocitos T. MHC, complejo principal de histocompatibilidad clase II.

Células asesinas naturales o NK. Son un tipo de linfocitos que se encuentran principalmente en los nódulos linfoides y sangre. Aunque son linfocitos contienen gránulos citoplasmáticos llenos de enzimas. La función principal de las células NK es destruir células anormales (infectadas por virus o tumores). Las células anormales se distinguen por la disminución o falta del MHC en la superficie celular o por anticuerpos IgG unidos a la membrana plasmática, que es una marca para destruir a la célula. (Malhotra y Shanker 2011). Cuando las células NK reconocen las anomalías se activan y liberan las enzimas de sus gránulos como perforinas y granzimas, que van a formar poros en la membrana celular diana y provocar su muerte (Dokun *et al.*, 2001; Raulet 1996; Vargas *et al.*, 1996).

Además de los tipos celulares mencionados, las células cebadas (CCs) constituyen una estirpe inmunológica muy importante para el desarrollo de las reacciones inflamatorias, por lo que sus características se presentan a continuación.

Las Células Cebadas

Las células cebadas (CCs) son células hematopoyéticas que participan en la inmunidad innata. Durante el desarrollo embrionario se generan en el saco vitelino y después del nacimiento en la médula ósea (Figura 2). En el organismo adulto, tales precursores salen a la circulación sanguínea y de allí pasan a todos los tejidos vascularizados. Estas células maduran bajo la influencia de factores de crecimiento producidos localmente, en particular, el factor de células madre (SCF), así como la interleucina 3 (IL-3) (Frossi *et al.*, 2017).

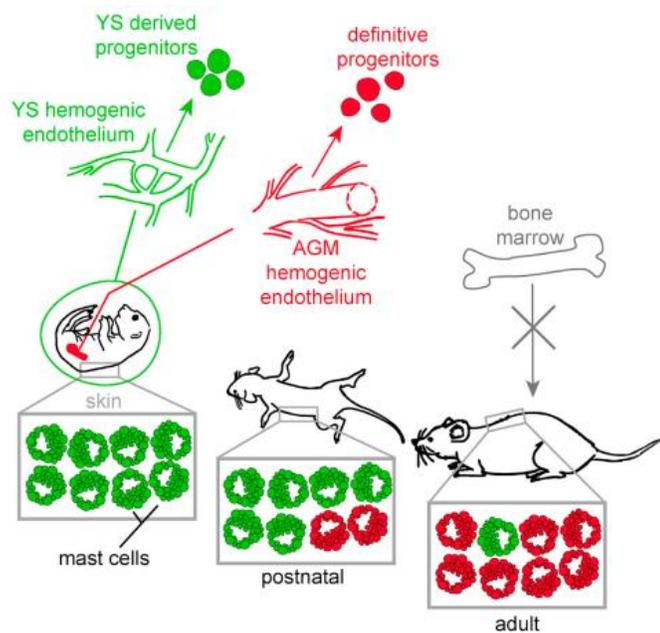


Figura 2. Origen de las células cebadas. Las CCs en el embrión son generadas a partir de progenitores derivados del saco vitelino (YS), después del nacimiento se originan del endotelio de la aorta gonado-mesonefros (AGM) y en adulto se originan en médula ósea. Durante la etapa embrionaria todas las CCs son derivadas del YS, después del nacimiento las CCs más abundantes siguen siendo de origen del YS, sin embargo, comienza a haber poblaciones de CCs de origen AGM. En el adulto, la mayor parte de CCs son originadas en médula ósea, sin embargo, hay poblaciones pequeñas de CCs derivadas de YS que residen en la piel. Endotelio hemogénico: endotelio con capacidad de generar células sanguíneas. Tomado de Gentek *et al.*, 2018.

Las células cebadas viven largo tiempo y son las primeras células del sistema innato que responden a estímulos del ambiente externo. Aunque su papel como iniciadoras de las reacciones alérgicas es bien conocido, su función es defender al hospedero de distintos patógenos y montar reacciones inflamatorias en respuesta a productos de daño tisular (Frossi *et al.*, 2018). Además, su papel no está limitado a la defensa, sino que también contribuyen a la cicatrización de heridas, la angiogénesis, la inflamación crónica, diversas enfermedades autoinmunes y al desarrollo de cáncer (Newton y Dixit, 2012).

Dentro de las características morfológicas más distinguibles de las CCs se encuentra la presencia de numerosos gránulos secretores electrodensos que ocupan la mayor parte de su citoplasma y que contienen mediadores inflamatorios pre-formados (Figura 3). Los gránulos pueden contener enzimas como triptasa, quimasa y β -hexosaminidasa, además de moléculas como histamina y serotonina (Ashley y Soman, 2013; Frossi *et al.*, 2018).

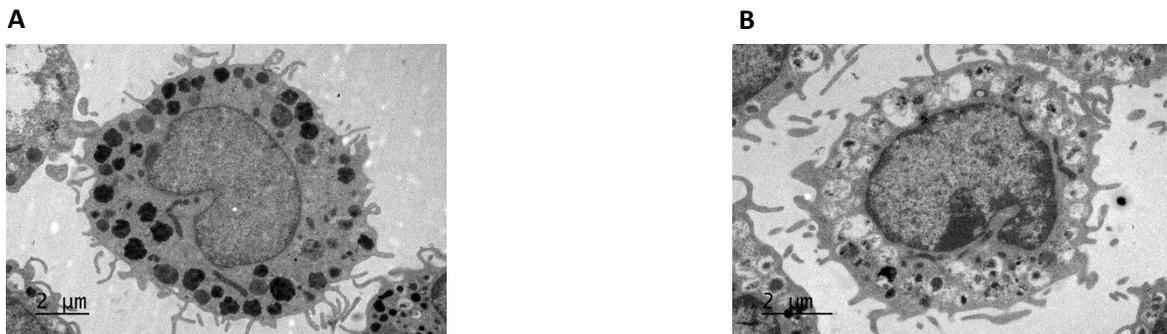


Figura 3. Células cebadas. Micrografía electrónica que muestra el alto contenido de gránulos. (A) célula cebada en reposo, (B) célula cebada desgranulando. Microscopia electrónica de transmisión, proporcionadas por Jesabel Pérez, laboratorio 11.

Diversos estudios han demostrado que las CCs tienen distintos mecanismos para liberar mediadores inflamatorios. Uno de los más importantes es la desgranulación anafiláctica, que consiste en la liberación brusca del contenido granular por un proceso que requiere altas concentraciones de calcio y cambios evidentes en el citoesqueleto. Dicha desgranulación puede ocurrir en respuesta a varios estímulos externos,

incluyendo el entrecruzamiento del receptor de alta afinidad para la IgE (F ϵ cRI, Figura 4). El proceso de desgranulación también es activado por neuropéptidos y algunas toxinas. El F ϵ cRI reconoce a la porción Fc de la IgE. La IgE, al unirse al receptor, activa una vía de señalización de baja intensidad que lleva a la síntesis de mediadores que son almacenados en los gránulos (Figura 4). Este efecto de la IgE es muy importante ya que está involucrado en la maduración de las células cebadas (Ulrich y Rivera, 2004).

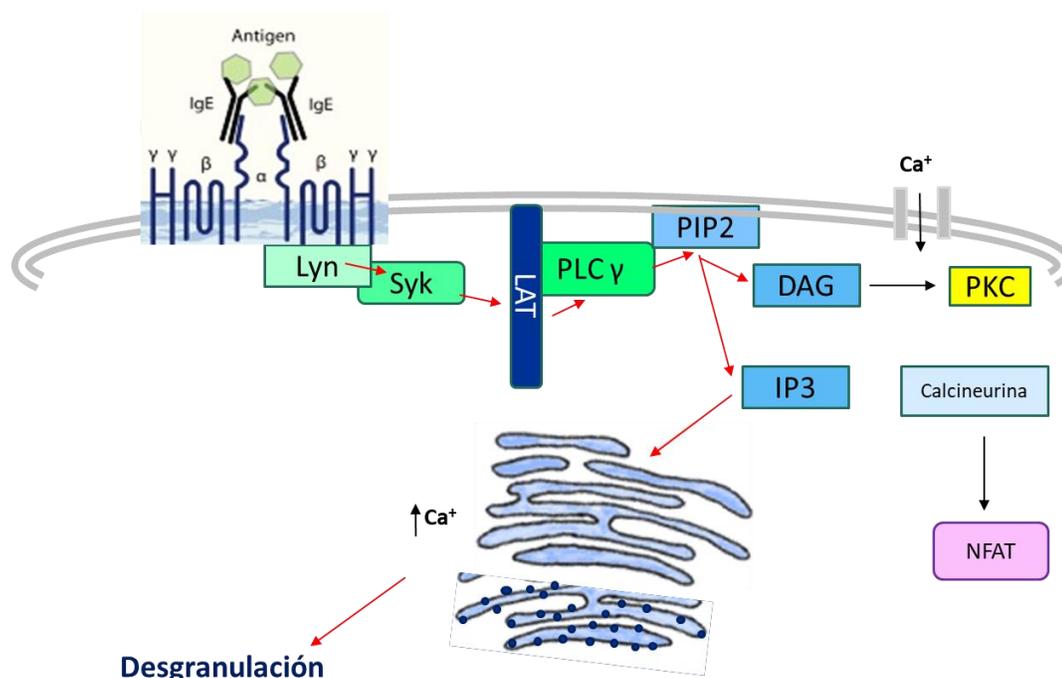


Figura 4. Entrecruzamiento del receptor de alta afinidad para la IgE (F ϵ cRI). Los F ϵ cRI reconocen IgE y éstas pueden unir a dos receptores F ϵ cRI y una vez que llega un antígeno, los receptores F ϵ cRI activan la cascada de señalización que lleva a la activación de la fosfolipasa C gamma (PLC γ), la cual hidroliza al fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP2) en diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3). El IP3 abre canales de calcio del retículo endoplasmático liso, se elevan las concentraciones de calcio y ocurre la desgranulación. Modificado de Newton y Dixit, 2012.

Sensibilización y Activación a Través del F ϵ cRI

A la unión de la IgE al F ϵ cRI, junto con los cambios inducidos, se le conoce con el nombre de proceso de sensibilización. Algunos de los cambios que genera esta unión

son incremento en la expresión del receptor $Fc\epsilon RI$ en la membrana plasmática, aumento en la sobrevivencia celular y aumento en el contenido de histamina en los gránulos. La sensibilización aumenta las respuestas inducidas por complejos de IgE con antígenos específicos, tales como como la secreción de grandes cantidades de interleucina (IL)-4, IL-3, β -hexosaminidasa, serotonina, factor de necrosis tumoral (TNF)- α , quimiocina CCL3 y otros mediadores, aumentando la intensidad de la reacción alérgica (Figura 5, Medina *et al.*, 2011).

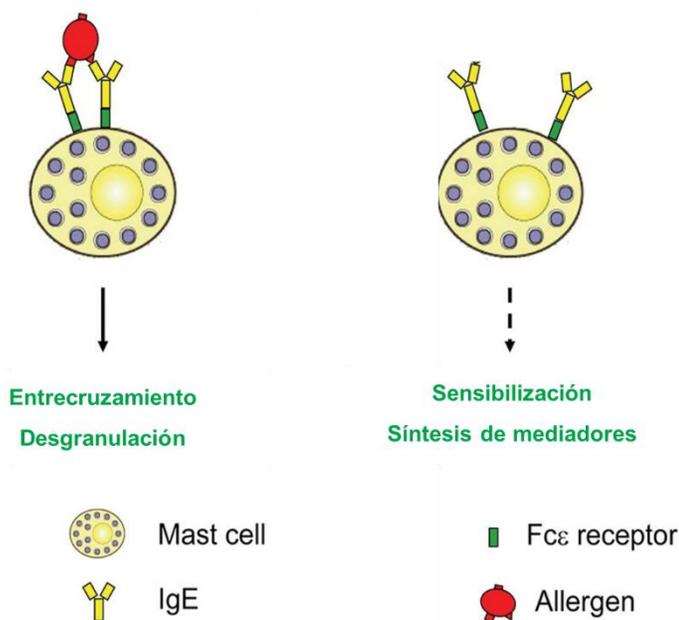


Figura 5. Sensibilización de células cebadas. La sensibilización es inducida por la IgE monomérica y al ser reconocida por el $Fc\epsilon RI$, induce a la célula a sintetizar moléculas, para terminar de llenar sus gránulos. La liberación de los gránulos se efectúa hasta que se entrecruzan los receptores $Fc\epsilon RI$. Modificado de Sommergruber *et al.*, 2011.

Receptores de la Inmunidad Innata

Las células fagocíticas, así como las CCs, reconocen la invasión de patógenos o el daño celular por medio de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Estos receptores detectan directa o indirectamente patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), tales como ácidos nucleicos metilados, lipoproteínas, carbohidratos, proteínas mal plegadas y otros (Newton y Dixit, 2012; Tsukamoto *et al.*, 2018). Una vez activados, los PRRs

oligomerizan y ensamblan grandes complejos de múltiples subunidades que inician las cascadas de señalización que promueven la liberación de mediadores, desencadenando el reclutamiento de leucocitos a la región afectada (Abbas *et al.*, 2015; Frossi *et al.*, 2017). Existen principalmente, tres familias de PRRs: los receptores NOD (NLR), Rig (RLR) y tipo Toll (TLR, Figura 6).

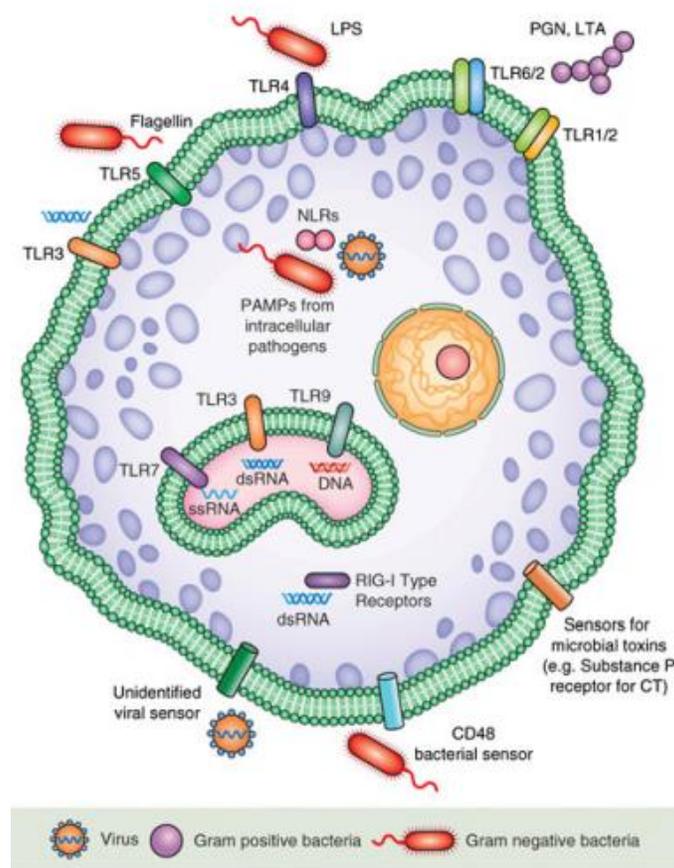


Figura 6. Receptores de reconocimiento de patrones (PRR) en células cebadas. Los receptores NLR y RIG son intracelulares, mientras que los TLR se encuentra en el interior y en la membrana plasmática. Tomado de Ashley y Soman, 2013.

La familia de receptores NOD (dominio de oligomerización y unión a nucleótidos) incluye 22 miembros de proteínas identificadas en humanos. Están formados por un dominio de reconocimiento rico en leucinas que detecta los PAMPs o DAMPs, un dominio central de oligomerización y un dominio de señalización que puede contener dominios de reclutamiento y activación de caspasas (CARD). Basándose en sus

variaciones, los receptores Nod están divididos en cinco familias: NLRA, NLRB, NLRC, NLRP y NLRX (Motta *et al.*, 2014, Figura 7). La función de los NLR es identificar microorganismos que logran ingresar al interior de la célula o aquellos productos de patógenos que alcanzan el citosol. Al reconocerlos se induce la producción de citocinas proinflamatorias y de péptidos antimicrobianos. Los receptores NOD1 y NOD2 pueden inducir la expresión de genes a través del NF- κ B (Platnich y Muruve, 2019; Gomes *et al.*, 2019).

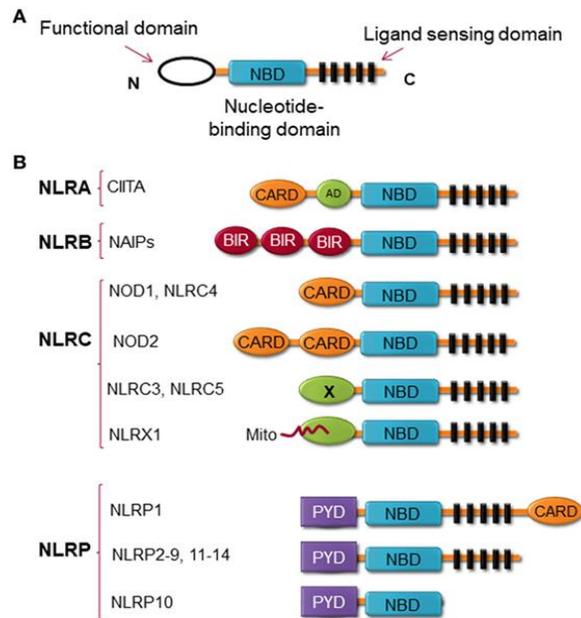


Figura 7. Receptores NOD. (A) Estructura del NLR constituida por tres dominios principalmente, uno rico en leucinas representado con líneas negras, este dominio reconoce a los PAMs o DAMPs, dominio central de oligomerización representado con cuadros azules, dominio de señalización representado con óvalos blancos, algunos tipos de receptor pueden contener el dominio CARD, como es el caso de CIITA, NOD1, NLRC4 y NOD2. (B) Familias de NLR. Tomado de Gharagozloo *et al.*, 2018.

Los receptores RIG (gen inducible por ácido retinoico) son enzimas con actividad de helicasa (separan las hebras de DNA o RNA viral) de RNA. Poseen un dominio de reconocimiento de RNA viral de doble cadena y tiene dos dominios CARD de señalización que activan al factor regulador del interferón 3 (IRF3), que induce la producción de IFN- β . La función de estos receptores es sensor y eliminar patógenos

en el interior de la célula. Una de las herramientas que usan para bloquear la replicación viral es mediante el IFN- β . En una célula la inducción del interferón provoca la liberación de esta molécula. El interferón secretado por la célula infectada se pega a su receptor específico presente en otra célula no infectada. La unión del interferón con su receptor induce la producción de enzimas que inhiben la traducción del mRNA viral o enzimas que estimula la acción de endonucleasas que degradan el mRNA viral, así, la célula receptora del interferón queda protegida de la infección viral ([Boxx y Cheng, 2016](#)). Los RLR comprenden las familias RIG-I, MDA5 y LGP2. Las familias RIG-I y MDA5 tienen una estructura similar, un dominio en el extremo amino-terminal para reclutamiento y activación de caspasas (CARDs) un dominio central helicasa y un dominio carboxi-terminal, el cual reconoce el RNA viral (Newton y Dixit, 2012). El dominio CARD de los receptores RLR, tipo RIG-I y MDA5, está involucrado en la activación y señalización de la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS). MAVS activa a factores asociados al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF6, y TRAF3), así como la caspasa 8 y la caspasa 10. El factor TRAF6 activan al factor de transcripción NF- κ B, para promover la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, mientras que TRAF3 activa a los IRF, para inducir la síntesis de INF- β . MAVS también promueve el reclutamiento de diferentes proteínas con dominio de muerte asociado a TNF (TRADD), Fas (FADD), que desencadenan la muerte celular. (Figura 8, Raghuraman *et al.*, 2017; Yong y Luo, 2018; Castanier *et al.*, 2010).

Los receptores Toll-Like (TLR) se encuentran en células como macrófagos, células dendríticas, células NK, células cebadas, neutrófilos, así como linfocitos T y B. También se encuentran en células no inmunes como fibroblastos, células epiteliales, microglia, astrocitos y queratinocitos. Los TLR se localizan en la superficie celular (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 y 11) y algunos en el interior de la célula en compartimentos endosomales (TLR3, 7, 8 y 9). También pueden formar homodímeros y heterodímeros (Brito *et al.*, 2013; O'Neill y Bowie, 2007). Estos receptores tienen un amplio rango de ligandos que incluyen motivos estructurales presentes en bacterias, hongos levaduras y parásitos, así como algunos componentes derivados de los tejidos del hospedero. (De Nardo, 2015, Czerkies y Kwiatkowska, 2014).

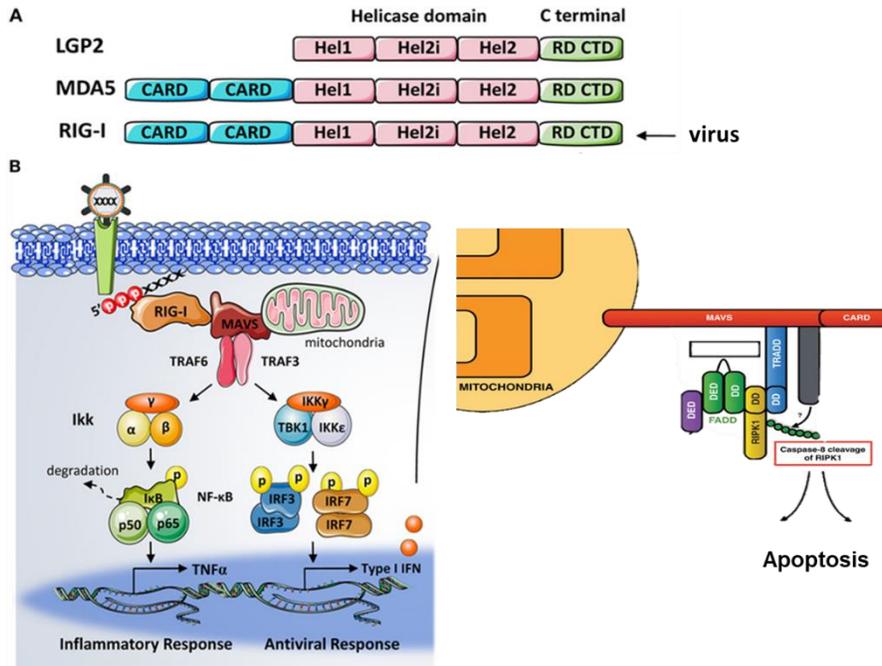


Figura 8. Receptores RLR. (A) Familia de receptores RIG, rectángulos verdes representan el dominio de unión al DNA o RNA viral, los rectángulos rosas el dominio helicasa (abre cadenas de ácidos nucleicos), rectángulos azules representan el dominio CARD (dominio de unión a caspasas). (B) Vías de señalización, por una parte, se puede activar TRAF6 que lleva a la activación de NF-κB y por lo tanto a la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, por otra parte, se puede activar TRAF3, que a su vez activa a los IRF y lleva a la síntesis de INF-β. MAVS también puede reclutar a TRADD y FADD y de esta forma desencadenar la muerte celular. Modificado de [Liu et al., 2017](#) y [Riley et al., 2015](#).

En cuanto a su estructura los TLRs están conformados por tres módulos: un módulo extracelular en forma de herradura, donde se encuentra el amino terminal, así como una zona rica en leucinas; el segundo módulo es transmembranal y el tercer módulo es intracelular con un dominio TIR y el carboxilo terminal (Akira y Takeda, 2004; Chen *et al.*, 2016). El receptor más estudiado de la familia de los TLR es el 4, por su enorme importancia en la respuesta a infecciones bacterianas por organismos Gram-negativos.

Células Cebadas y la Inmunidad Innata

Las células cebadas tienen un papel importante en la infección. El mecanismo mediante el cual combaten bacterias es liberando citocinas, quimiocinas, mediadores proinflamatorios o péptidos antimicrobianos (Bblewska *et al.*, 2012). A pesar de que se han realizado estudios dirigidos a averiguar si las CCs pueden endocitar bacterias, los resultados no han sido concluyentes.

Las CCs pueden ser activadas por contacto directo con la bacteria, por componentes bacterianos o productos secretados por esas bacterias, los cuales son reconocidos por distintos tipos de receptores como los NOD, RIG-1 y TLR. Una vez activadas, las CCs liberan distintos mediadores como histamina, proteasas y leucotrienos que regulan la permeabilidad y el flujo vascular, facilitando el reclutamiento celular de la circulación al sitio de infección, mediante la regulación de moléculas de adhesión en el endotelio vascular. Otros mediadores liberados son TNF, IL-6, IL-1 β , así como IL-13 cuya función es reclutar neutrófilos y macrófagos a la zona de infección para fagocitar a las bacterias (Varadarajaloul *et al.*, 2003; Wernersson y Pejler, 2014). Las CCs reclutan un tipo de célula en respuesta a un tipo de patógeno, por ejemplo, neutrófilos al sitio de infección por bacterias, eosinófilo al sitio infectado por parásitos o células NK al sitio de infección viral (Ashley y Soman 2013).

Malaviya, (1996) realizó experimentos con ratones deficientes en células cebadas W/W^v a los que inyectó bacterias Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae*), los sacrificó y realizó el conteo de bacterias, encontrando que el número de bacterias había aumentado significativamente, mientras que en los ratones WT el número de bacterias había disminuido. Posteriormente aumentó la dosis de bacterias Gram negativas y el 80% de ratones deficientes en CCs murió. Al reconstituir ratones con CCs antes de inyectar las bacterias éstos lograron sobrevivir. Etchenacher, 1996; Supajatura, 2001 y Supajatura 2002 realizaron experimentos similares a los de Malaviya, pero ahora en modelos de peritonitis aguda, encontrando los mismos resultados: que ratones W/W^v con peritonitis aguda mueren, mientras que al reconstituirlos con CCs logran sobrevivir. Etchenacher reconstituyó ratones W/W^v con peritonitis aguda, posteriormente inyectó

un bloqueador de TNF- α ; el resultado fue que se perdió la protección. Ávila y González (2011) también usaron ratones W/W^v, a los que les inyectó bacterias Gram negativas intraperitonealmente, la infección progresó rápidamente y en algunos causó la muerte. Sin embargo, al ser reconstituidos con BMMCs incrementaron rápidamente la producción de TNF- α , y, por lo tanto, la infección fue combatida. Estos estudios demostraron que las células cebadas son requeridas para defender al hospedero de infecciones bacterianas. Los organismos constantemente están expuestos a varios tipos de antígenos o microbios que se encuentran en el ambiente y estos pueden ser inhalados o ingeridos en el alimento (Murray y Wynn, 2011). Una respuesta inmune adecuada garantiza la integridad y resistencia del organismo a infecciones. En humanos la susceptibilidad a infecciones y síndromes ha sido directamente correlacionada con una función inadecuada en los TLRs, causando meningitis, sepsis, artritis, osteomielitis y abscesos (Li y Cherayil, 2004).

El Receptor TLR4 y su Sistema de Señalización

El receptor TLR4 tiene proteínas accesorias y co-receptoras que son necesarias para su función. Una proteína accesoria del receptor TLR4 es la proteína de unión al lipopolisacárido bacteriano (LBP) que está constituida por 481 amino ácidos y se une con alta afinidad al lipopolisacárido y ayuda a presentarlo al complejo receptor de la membrana celular (Lee y Ploegh, 2012). Otra proteína accesoria es MD2, que tiene 160 aminoácidos, y se asocia con el dominio extracelular del receptor TLR4. MD2 es requerida para la unión del ligando y la dimerización del mismo. El receptor TLR4 es el único de los receptores TLR que requiere una molécula accesoria, para unir al ligando (Figura 9). Finalmente, la proteína transmembranal CD14 es otro elemento que forma parte del complejo del receptor TLR4 y su función no está completamente establecida en todos los tipos celulares del sistema inmune (Tsukamoto *et al.*, 2018; Zanoni y Granucci, 2013).

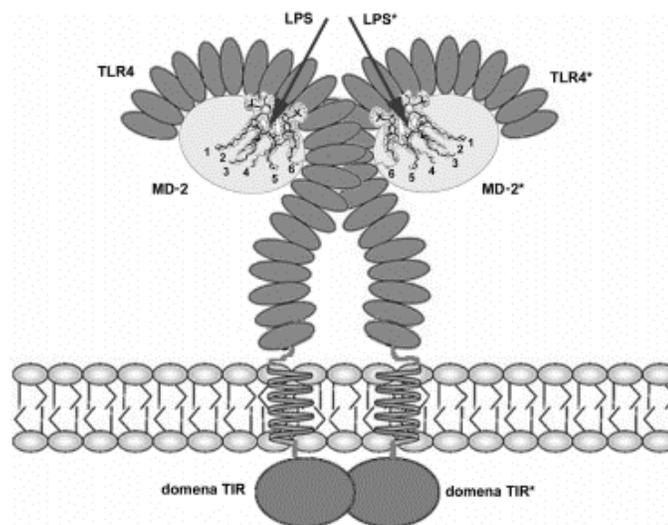


Figura 9. Estructura del receptor Toll-like 4. Cada uno de los monómeros del receptor TLR4 está conformado por tres módulos, uno extracelular, donde se encuentran secuencias repetidas en leucina, otro que atraviesa en la membrana plasmática y el tercer módulo, intracelular donde se encuentra el dominio TIR. También se encuentra la proteína accesoria MD2, que ayuda a unir el ligando (LPS) al receptor. Tomado de Czerkies y Kwiatkowska, 2014.

Aunque el TLR4 reconoce a múltiples ligandos, el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram-negativas es el más estudiado.

El lipopolisacárido

El LPS es una molécula cargada negativamente que puede ser dividida en tres regiones: la porción del lípido A, que está embebido, en la membrana externa, el núcleo de oligosacáridos y el antígeno O que se extiende hacia el exterior de la bacteria. La región del lípido A representa el centro de reconocimiento específico, por los receptores (Figura 10, Lehrer *et al.*, 2007; Beutler y Rietschel, 2003).

Los LPS que poseen los tres dominios se llaman LPS (S) o formas lisas, mientras que los LPS que carecen del antígeno O se nombran LPS (R) o rugosos, aunque también se les denomina lipooligosacáridos (LOS). Existen diferencias en la estructura del lípido A entre las especies de bacterias, ya que las acilaciones de ácidos grasos con 12 o 14 carbonos puede variar. El antígeno O, también llamado polisacárido O-

específico, también puede variar en el monosacáridos que pueden estar unidos por diferentes tipos de enlaces glucosídicos (Kanevskiy *et al.*, 2019; Kanevskiy *et al.*, 2002).

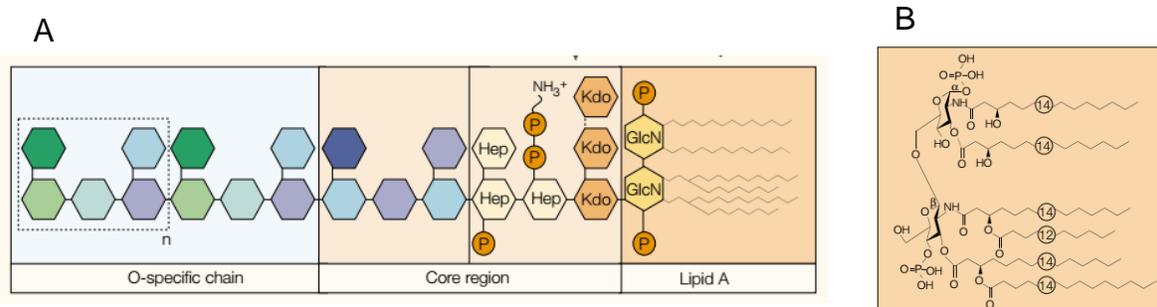


Figura 10. Estructura del Lipopolisacárido (LPS). (A) El LPS está conformado por tres regiones: el antígeno O, el núcleo de oligosacáridos y la porción del lípido A. (B) La porción del lípido A, esta es la región de reconocimiento por los receptores. Tomado de Beutler y Rietschel, 2003.

Estas diferencias se pueden generar en respuesta a los medios ambientales en los que se desarrollan las bacterias y pueden ocasionar que el reconocimiento del lípido A por TLR4/MD2 sea más débil, permitiendo que las bacterias puedan evadir la respuesta inmune innata, ocasionando fiebre, aumento de la frecuencia cardíaca e incluso llevar a la muerte por un choque séptico (Aldapa *et al.*, 2016).

El proceso por el cual el TLR4 reconoce al LPS es complejo. Los pasos principales son los siguientes:

- 1) El LPS es reconocido por la LBP.
- 2) La proteína LBP presenta al LPS a un co-receptor membranal llamado CD14.
- 3) CD14 une al LPS (ya sea libre o unido a LBP) y lo presenta al complejo TLR4-MD2
- 4) El complejo TLR4-MD2 unido al LPS sufre un cambio conformacional que inicia la cascada de señalización del receptor.

La activación del TLR4 induce la formación de complejos multiprotéicos a través de diferentes proteínas adaptadoras que contienen el dominio TIR (Figura 10, Yang *et al.*,

2016). Se conocen cinco proteínas adaptadoras: MyD88, TIRAP (MAL), TRAM, TRIF y SARM (De Nardo, 2015). Dichas proteínas adaptadoras pueden reclutar y activar a otras proteínas, incluyendo la cinasa asociada al receptor IL-1 (IRAK1-4), así como proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y ligasas de ubiquitinas como TRAF6. El resultado de la activación de ese sistema de señalización es regular la transcripción de genes mediante factores de transcripción como NF- κ B, AP-1, IRFs y NFAT (Figura 11, Tsukamoto *et al.*, 2018, Dietrich *et al.*, 2010).

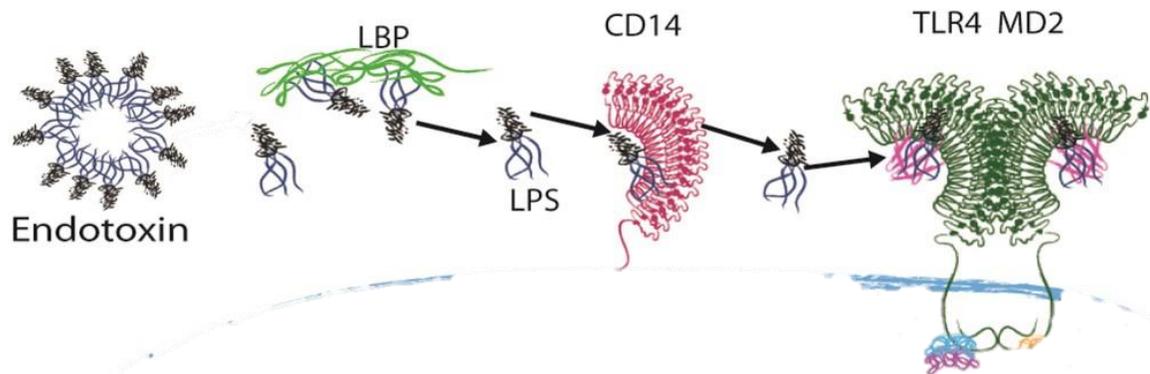


Figura 11. Mecanismo de reconocimiento del LPS. El LPS ingresa al organismo y es reconocido por la LBP, CD14 reconoce al LPS unido a la proteína LBP o de forma libre y se une a él, para presentarlo al complejo TLR4-MD2, MD2 une el LPS al TLR4. Una vez que el LPS se une al complejo TLR4-MD2, el TLR4 tiene cambio conformacional, exponiendo su dominio TIR, para unir a proteínas adaptadoras y activar cascadas de señalización. Tomado de Nijland *et al.*, 2014.

Señalización de la vía dependiente de MyD88

Cuando el complejo TLR4-MD2 es activado por el LPS, los TLR4 forman el dímero y tienen un cambio conformacional, en el que exponen sus dominios TIR, para ser reconocidos por las proteínas adaptadoras MyD88/TIRAM. Las proteínas adaptadoras reclutan a IRAK 1, IRAK4, donde IRAK 4 fosforila a IRAK 1 y activa a TRAF6. TRAF6 ubiquitina al complejo IKK también llamado como NEMO (IKK- α , IKK- β , IKK γ). NEMO fosforila a I κ B y lo lleva a su degradación. Cuando se degrada I κ B, se libera el factor de transcripción NF- κ B, que se transloca al núcleo e inicia la síntesis de mRNA para diversas citocinas, como TNF, IL-6, e IL-1 β . TRAF6 también puede activar la vía de las MAPKs (JNK, ERK, p-38), para después, fosforilar a factores de transcripción como

CREB o AP-1 (Takeda y Akira, 2004; Dinarello, 2009; Jeoung *et al.*, 2009; Hemanshu *et al.*, 2012). Los factores de transcripción se traslocan al núcleo, para inducir la síntesis de mRNA de citocinas pro-inflamatorias (Figura 12).

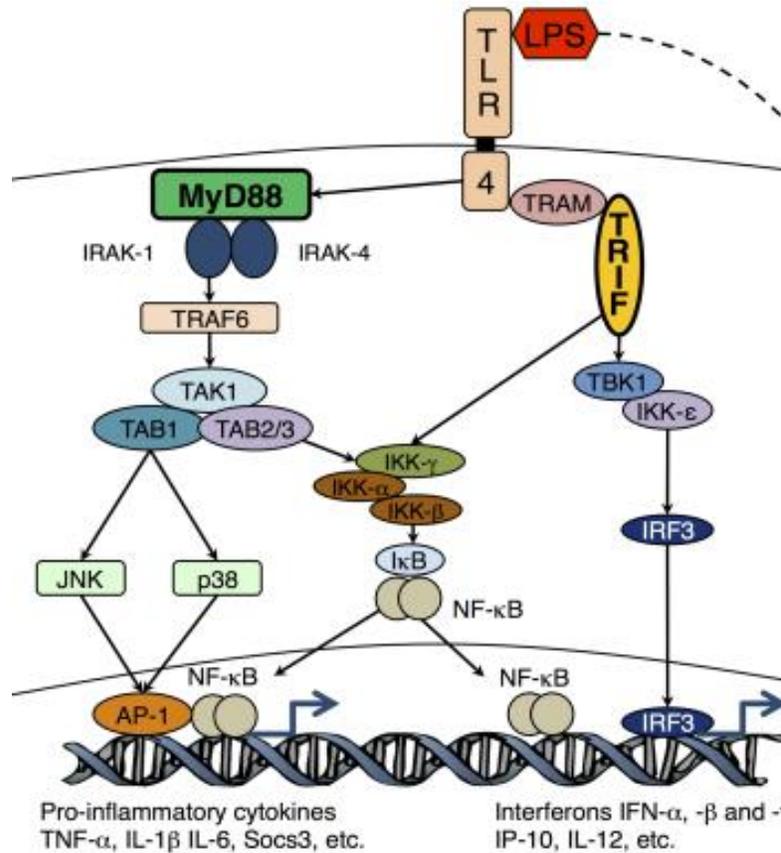


Figura 12. Vías de señalización canónicas activadas por el receptor TLR4. Vía dependiente de MyD88, una vez que el LPS se une al complejo TLR4-MD2 se dimeriza el receptor y tiene un cambio conformación, el cual expone los dominios TIR intracelulares, a los cuales se unen las proteínas adaptadoras MyD88 y TRAM. Las proteínas adaptadoras reclutan a las proteínas IRAK 1, IRAK 4 y TRAF6 y se induce la asociación de IRAK 1 a MYD88. IRAK 4 después fosforila a IRAK 1. Las IRAKs fosforiladas activan a TRAF6 que se autoubiquitina, para interactuar con TAK 1, TAB1, TAB2 y TAB3. TAK1 una vez activado fosforila al complejo IKK (IKK- α , IKK- β e IKK- γ) el cual a su vez fosforila al I κ B, para liberar al factor de transcripción NF- κ B. NF- κ B se trasloca al núcleo, para inducir la síntesis de citocinas proinflamatorias. TAK 1 también puede activar a las MAPKs (p38, ERK y JNK) que induce la activación del factor de transcripción AP-1, para inducir la síntesis de citocinas proinflamatorias. Vía dependiente de TRIF: el complejo TLR4-MD2 una vez activado es internalizado junto con CD14. CD14 activa a las proteínas adaptadoras TRIF-TRAM, las cuales reclutan a TBK1, IKK ϵ , IKK i , para activar al factor de transcripción IRF3, que migra al núcleo y favorece la síntesis del INF- β . Tomado de Piras y Selvarajoo, 2014.

Existen mecanismos de regulación del mRNA, que permiten que se acorte o alargue el tiempo de vida media del mRNA. Estos mecanismos involucran a proteínas destabilizadoras llamadas tristetrapolinas (TTP) las cuales se unen a la cola de poliadeninas (poli-A) del mRNA y lo degradan. Al degradar la cola de poli-A, el mRNA es susceptible a degradación por endonucleasas (Hochdörer *et al.*, 2013). También hay proteínas estabilizadoras, como HuR, que se unen a los elementos ricos en adenina y uracilo (ARE), evitando que se degrade la cola de poli-A del mRNA y de esta forma aumenta su tiempo de vida (Figura 13, Cai *et al.*, 2019).

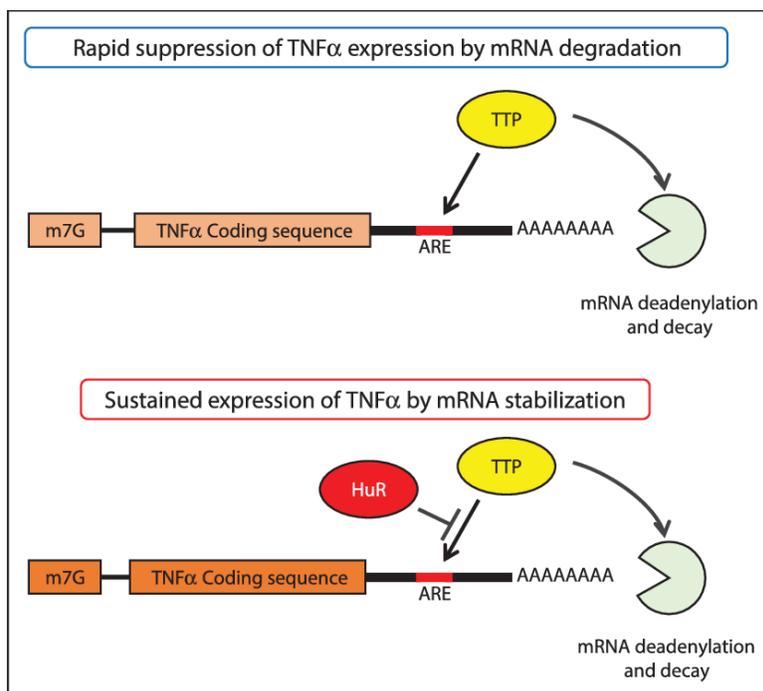


Figura 13. Estabilización del mRNA. El panel superior corresponde a la desestabilización del mRNA, por parte de la TTPs, la cual degrada la cola de poli-A. El panel inferior muestra la estabilización del mRNA, por parte de HuR que se une a los elementos ricos en adenina y uracilo (ARE), evitando la degradación del mRNA y por lo tanto alargando el tiempo de vida del mRNA. Tomado de Nakayama *et al.*, 2016.

Señalización de la vía dependiente de TRIF

Los receptores TLR4-MD2 y CD14 se internalizan después del reconocimiento y unión del LPS. La endocitosis del complejo TLR4/CD14 sólo se ha descrito en células dendríticas, macrófagos y células epiteliales (Roy *et al.*, 2014) y es un proceso

dependiente de CD14. Los receptores son internalizados en endosomas recubiertos por clatrina, proteína que ayuda a la formación de la vesícula. Para que la vesícula termine de formarse y se desprenda de la membrana celular se requiere de la GTPasa dinamina (Figura 14, Wang *et al.*, 2012, Hung *et al.*, 2016). Existen fármacos que antagonizan a la dinamina, un ejemplo es el dynasore, que evitan la formación de vesículas.

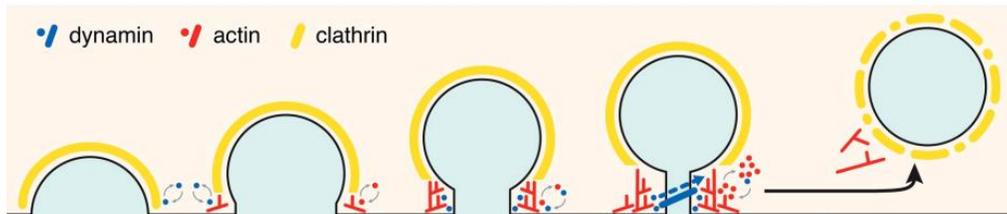


Figura 14. Mecanismo de acción de la dinamina. La dinamina es una GTPasa que ayuda a la formación de vesículas, sellando el endosoma, para que pueda desprenderse de la membrana plasmática. El dynasore bloquea a la dinamina, evitando la formación del endosoma. Tomado de Grassart *et al.*, 2014.

Las vesículas o endosomas van madurando conforme se van internalizando en la célula. Los endosomas más cercanos a la membrana plasmática se denominan tempranos y los más cercanos al núcleo se llaman tardíos. Cerca del núcleo se encuentra una zona llamada nube perinuclear, que es una zona de unión de endosomas que se encargan del reciclamiento de receptores (Dellibovi y Altan, 2016).

Una vez formado el endosoma con el complejo TLR4/CD14 dentro, el co-receptor CD14 activa a las proteínas TRIF y TRAM que inician la cascada de señalización, reclutando a TBK1, IKK ϵ , IKK ι , para activar al factor de transcripción IRF3, que migra al núcleo y favorece la síntesis del interferón (IFN)- β (Figura 12, Chung *et al.*, 2018; Shim *et al.*, 2015; Black *et al.* 2013).

Vía de Señalización No Canónica

El CD14 es una glicoproteína de 375 amino ácidos que tiene una estructura extracelular similar al receptor TLR4: una herradura rica en leucinas que se encuentra en forma soluble en la sangre o anclada a la membrana plasmática por medio de una molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI). El CD14 puede unir una variedad de productos microbianos, así como sus análogos sintéticos: LPS, peptidoglicano, polyI:C, CpG DNA (Gorskaya *et al.*, 2017; Tsukamoto *et al.*, 2018).

En algunas células (macrófagos, células dendríticas y células epiteliales) se ha descrito que el CD14 es requerido para la endocitosis del TLR4 y que tal evento activa algunas vías de señalización (Chung *et al.*, 2018; Shim *et al.*, 2015; Black *et al.* 2013; Rajaiah *et al.*, 2015). Para que ocurra la endocitosis, además de CD14 se requieren dos proteínas: clatrina que reviste al endosoma y ayuda a su formación y dinamina que es una GTPasa que rompe la membrana plasmática para que termine de formarse el endosoma y pueda desprenderse de ella (Wang *et al.*, 2012).

Recientemente se demostró que, a pesar de no tener una región citoplásmica de gran tamaño, la molécula CD14 tiene la capacidad de transducir señales de manera independiente del TLR4. En células dendríticas estimuladas con LPS, el CD14 ocasiona la activación de Syk y la PLC γ 2. La PLC γ 2 hidroliza fosfatidil inositol (PIP2) de la membrana plasmática, generando inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), lo cual incrementa la concentración de calcio intracelular y activa a la fosfatasa calcineurina (CN). El factor de transcripción NFAT citoplasmático, una vez desfosforilado por la calcineurina, migra al núcleo y permite la síntesis del mRNA de citocinas como la IL-2 y la IL-4 (Figura 15, Zanoni y Granucci, 2013, Fric *et al.* 2018; Tsukamoto *et al.*, 2018).

Las funciones del co-receptor CD14 en el sistema de señalización del receptor TLR4 no se conocen completamente y al ser una proteína presente en casi todas las células del sistema inmune, su papel en la activación de vías específicas y en la secreción de mediadores inflamatorios no se ha descrito en todas las células del sistema inmune.

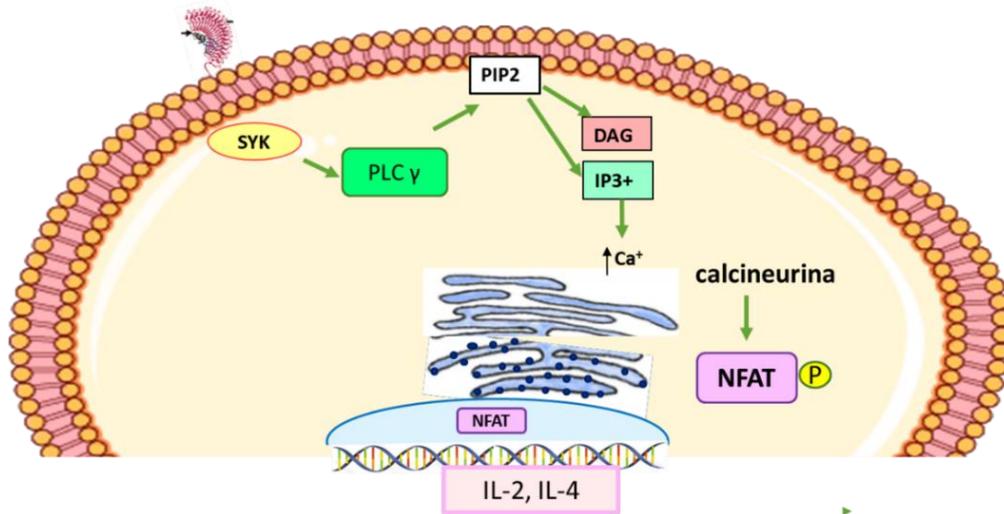


Figura 15. Vía de señalización no canónica. CD14 puede activar a la cinasa Syk y éste a su vez a la PLCγ2. La PLCγ2 actúa sobre el fosfolípido fosfatidil inositol (PIP2), el fosfolípido hidrolizado genera inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El inositol trifosfato libera calcio del retículo endoplasmático, el cual incrementa la concentración de calcio intracelular y activa a la fosfatasa calcineurina (CN). La calcineurina desfosforila al factor de transcripción NFAT citoplasmático y una vez desfosforilado se trasloca al núcleo donde permite la síntesis del mRNA de citocinas como la IL-2 y la IL-4. Modificado de Zanoni y Granucci, 2013.

ANTECEDENTES

Diversos laboratorios, incluyendo el nuestro, han dedicado sus esfuerzos a entender cómo las células del sistema inmune innato pueden responder al LPS. De manera particular, los esfuerzos se han concentrado en aquellas vías de señalización activadas por el receptor TLR4 y el papel que puede tener CD14 en la activación de vías intracelulares que lleven a la síntesis de citocinas. Recientemente, encontramos que las células cebadas derivadas de la médula ósea (BMMCs) de ratones C57BL6/J presentan inmunoreactividad membranal e intracelular para el co-receptor CD14 y para el receptor TLR4. En respuesta a un reto con LPS, ambos receptores se movilizan juntos hacia la región perinuclear (Román, 2017). Sin embargo, parte del CD14 se moviliza de forma independiente del TLR4 (Figura 16). Esto nos ha llevado a reflexionar sobre la función del CD14, puesto que si fuera estrictamente un co-receptor del receptor TLR4, todo o gran parte de esa molécula debería translocarse junto con el TLR4, tal y como ocurre en otras células del sistema inmune, como los macrófagos (Chung *et al.*, 2018; Shim *et al.*, 2015; Black *et al.* 2013).

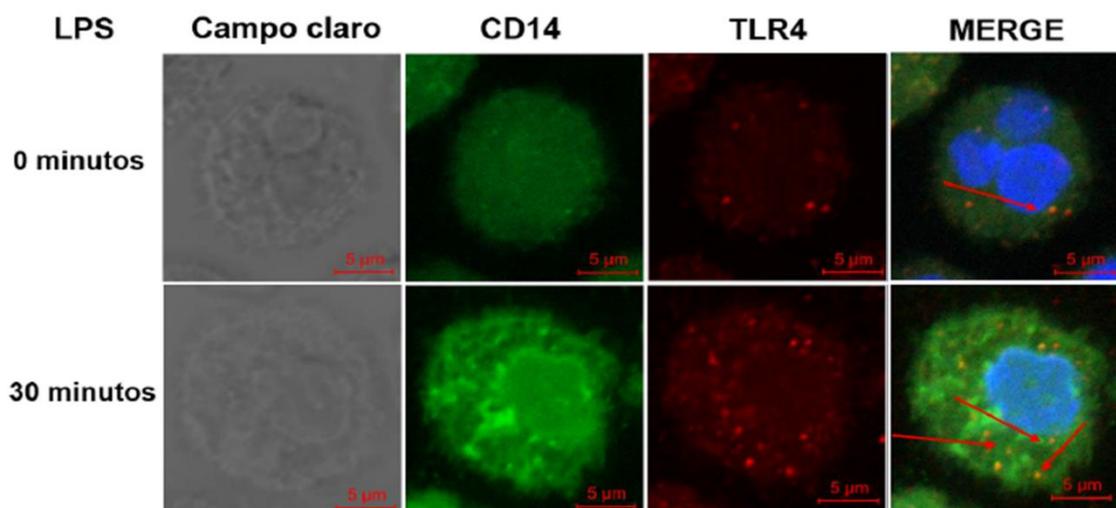


Figura 16. Inmunolocalización del receptor TLR4 y CD14 en BMMCs. Las células fueron tratadas o no con LPS durante 30 minutos antes de ser procesadas para microscopía confocal. Se muestran imágenes representativas de por lo menos diez células analizadas en tres experimentos independientes. Las flechas indican co-localización de ambos receptores (Román, 2017).

En nuestro laboratorio también se encontró que al pre-tratar BMCCs con dynasore (inhibidor altamente selectivo de la dinamina y, por lo tanto, de la endocitosis) antes de una exposición a LPS, se inhibe la translocación de CD14 a la región perinuclear y el TLR4 disminuye su desplazamiento hacia esa misma área. Por lo tanto, los datos indican, que probablemente las BMCCs internalizan el complejo TLR4/CD14 en endosomas (Figuras 17 y 18, Román, 2017) y también son capaces de internalizar a cada una de las moléculas por separado. La internalización del complejo TLR4/CD14 nos podría indicar la activación de la vía TRIF/TRAM, descrita hasta ahora sólo en macrófagos, células dendríticas y células endoteliales (Roy *et al.*, 2014).

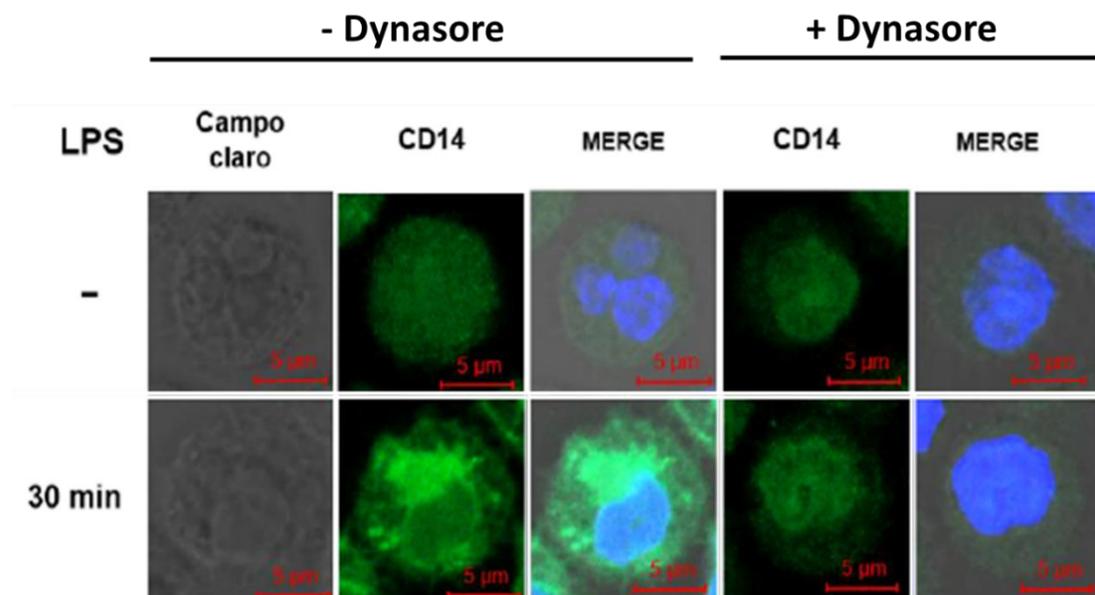


Figura 17. Localización de CD14 en respuesta a un estímulo con LPS y su sensibilidad a dynasore. Un millón de células de BMCCs fueron preincubadas con dynasore (80 μ M) o únicamente en medio de cultivo durante 15 minutos. Posteriormente fueron estimuladas con LPS durante 30 minutos, la reacción finalizó por centrifugación a 4°C. Después, las células fueron fijadas en laminillas electrocargadas e incubadas con DAPI y anti CD14-FITC. La fluorescencia se analizó mediante microscopia confocal (Román, 2017).

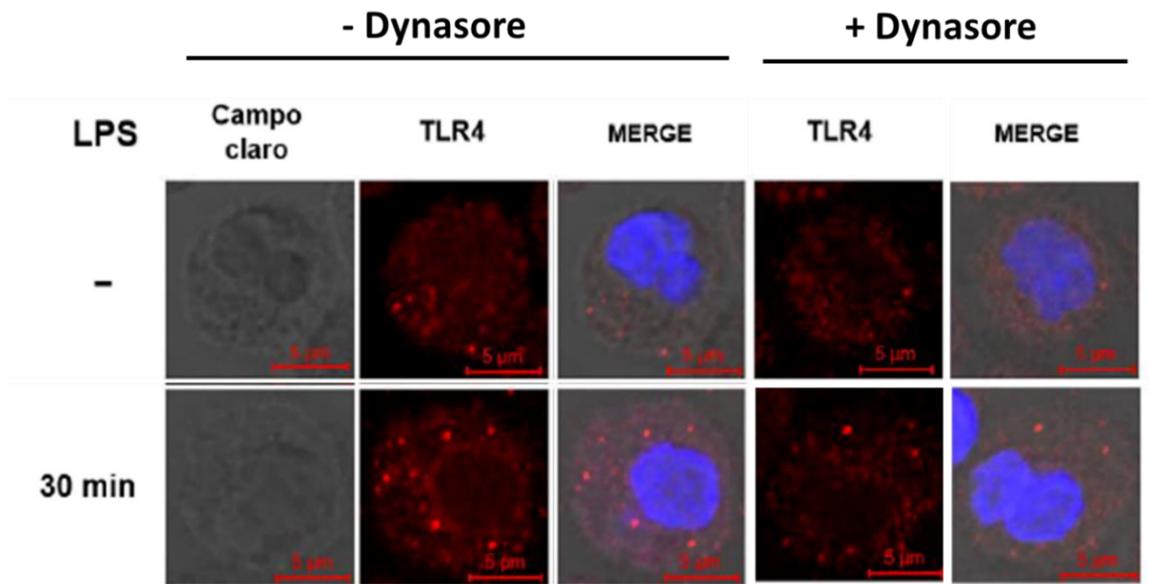


Figura 18. Localización del TLR4 en respuesta a un estímulo con LPS y su sensibilidad a dynasore. Un millón de células de BMMCs fueron preincubadas con dynasore (80 μM) o únicamente en medio de cultivo durante 15 minutos. Posteriormente fueron estimuladas con LPS a los 30 minutos, la reacción finalizó por centrifugación a 4°C. Después las células fueron fijadas en laminillas electrocargadas e incubadas con DAPI y anti TLR4-FICT. La fluorescencia se analizó mediante microscopia confocal (Román, 2017).

JUSTIFICACIÓN

Las células cebadas participan de manera muy importante en las respuestas de la inmunidad innata en contra de bacterias Gram-negativas, pero, hasta la fecha, no se han caracterizado todos los mecanismos moleculares que participan en la respuesta de las CCs al LPS. El hecho de que las CCs expresen CD14 y diversos receptores NOD, sugiere que el LPS podría activar vías independientes del TLR4 en este tipo celular.

HIPÓTESIS

El LPS activará vías de señalización que han sido consideradas dependientes del TLR4 en BMMCs que carecen de dicho receptor.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la posible activación por LPS de las vías de señalización canónicas asociadas al TLR4 en BMMCs que carecen del receptor.

Objetivos Particulares

En BMMCs derivadas de ratones WT y de ratones carentes del receptor TLR4, estimuladas con LPS, evaluar:

1. Sí se activa la vía de señalización dependiente de MyD88/TIRAP, mediante el análisis de la fosforilación ERK 1 / 2 y p38, así como de la expresión del mRNA de TNF- α , IL-6 y CCL2.
2. La presencia de la expresión del mRNA del IFN- β , como marcador de la activación de la vía dependiente de TRIF/TRAM.
3. Sí se activa la vía de señalización dependientes de CD14, mediante el análisis de la fosforilación de PKC- α y mediante expresión del mRNA de IL-4, así como IL-2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Anticuerpos

Tabla 1. Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Compañía	Ciudad	No. de catálogo	Dilución
anti-p-p38	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, E.U.	11852	1:10,000
anti-p-ERK ½	Cell Signaling Technology	Massachusetts, E.U.	9101	1:60,000
anti-p-PKC	Cell Signaling Technology	Massachusetts, E.U.	9375	1:5,000
β-actina	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, E.U.	F2111	1:10,000

Para detectar a p-ERK 1/2, p-p38 y p-PKC se utilizó un anticuerpo secundario anti-conejo, para la β-actinas se utilizó un anticuerpo anti-ratón (Tabla 2).

Tabla 2. Anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Compañía	Ciudad	No. de catálogo	Dilución
Anti-conejo	Jackson Immuno Reserch	Baltimore, E.U.	111-035- 003	1:15,000
Anti-ratón	Jackson Immuno Reserch	Baltimore, E.U.	115-003	1:15,000

Reactivos

Buffer Tyrodes-BSA (HEPES 20 mM a pH 7.4, MgCl₂ 1.8 Mm, NaCl 1 mM y CaCl₂ 135 mM), buffer Laemmli (480 µL de H₂O, 480 µL de Laemmli 2X, 20 µL de ortovanadato y 20 µL de β-mercaptoetanol), buffer de transferencia (3.79 g de trizma base, 18 g de glicina, 250 mL de metanol, 750 mL), TBS 10x, pH 7.5 (60 g de Trizma base, 90g de NaCl), TBS-T 1X, pH 7.5 (100 mL de TBS 10X, 900 mL H₂O y 1 mL de Tween 20), TBE 5X pH 8 (54 g de trizma base, 27.5 g de ácido bórico, 4.2 g de EDTA), TBE 1X (200 mL de TBE 5X, 800 mL de H₂O)

Ratones y Genotipificación

Se utilizaron ratones C57BL6/J WT y TLR4^{-/-}. Los ratones TLR4^{-/-} se compraron a Laboratorios Jackson (cepa B6.BIOSCN-TLR4^{lps-del / JthJ}). Estos ratones tienen una delección en el locus *Lps*, el cual codifica para el receptor TLR4. La genotipificación de los ratones se realizó por PCR genómico utilizando oligonucleótidos específicos recomendados por el proveedor con la siguiente secuencia sentido 5´ ATA-TGC-ATG-ATC-AAC-ACC-ACA-G 3´, antisentido 5´ TTTCCATTGCTGCCCTATAG 3´. Se amplificaron en 28 ciclos: ciclo 1: 94°C, 120 seg, ciclo 2: 94°C 20 seg, ciclo 3: 65°C 15 seg, ciclo 4: 68°C 10 seg, ciclo 5: repetir los pasos del 2-4 10 veces, ciclo 6: 94°C 15 seg, ciclo 7: 60°C 15 seg, ciclo 8: 72°C 10 seg, ciclo 9: repetir los pasos del 6-8 28 veces, ciclo 10: 72°C 120 seg, ciclo 11: 10°C extensión. Una vez que se amplificaron las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio (Figura 19).

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (protocolo 032/02 y 384/07). Nuestro laboratorio realizó la caracterización de algunos parámetros básicos de respuesta al LPS en animales completos y en BMBCs (ver anexo I).

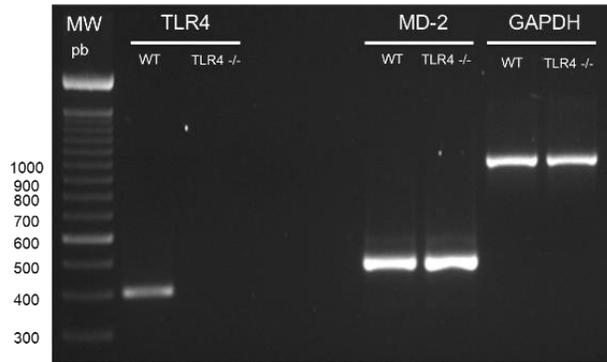


Figura 19. Genotipificación de ratones TLR4. Se extrajo ADN total de la cola de ratones TLR4^{-/-} y el locus *Ips* (correspondiente al gen del receptor TLR4) se amplificó por PCR utilizando oligonucleótidos específicos. Como control, se amplificaron por RT-PCR las secuencias de la proteína accesoria MD-2 y la enzima GAPDH (Alfredo Ibarra).

Obtención de BMBCs

Ratones C57BL/6J WT y TLR4^{-/-} de 6 a 8 semanas, se sacrificaron en una cámara de CO₂. Los huesos largos de las patas traseras se extrajeron y colocaron en cajas Petri, para obtener las células de la médula ósea mediante perfusión con una jeringa de insulina. Las células se colocaron en un medio de cultivo RPMI 1640 (cat. R4130-1L Sigma-Aldrich, St. Louis, E.U.) que contiene HEPES 1 Mm, estreptomina 100g/mL, penicilina 100 U/ml, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 100 mM y β-mercaptoetanol 5 μM. Además, se complementó con L-glutamina (cat. R4130 Sigma-Aldrich, St. Louis, E.U.) y adicionó IL-3 de origen murino (cat. 213-13x Preprotech, Princeton, E.U.) y suero fetal bovino al 10% (FBS cat. 261400779 GIBCO, Pittsburgh, E.U.). Las células con medio de cultivo se colocaron en una incubadora BINDER® a 37°C, con una atmósfera humidificada y 5% de CO₂. Se cambió el medio de cultivo cada semana. Para probar el estado de maduración de las células, se realizaron ensayos de citometría de flujo para determinar la expresión del receptor FcεRI en la membrana plasmática.

Estimulación de BMMCS y TLR4^{-/-} con LPS

Para todos los experimentos, incluyendo los grupos control, las BMMCs se sensibilizaron previamente con 100 ng/mL de anticuerpo IgE anti-DNP-HSA (Dinitrofenol de albúmina sérica humana). La sensibilización se realizó 24 horas antes de cada experimento a 37°C, con una atmosfera de CO₂ al 5%, en medio RPMI.

Las células sensibilizadas se resuspendieron en buffer Tyrodes-BSA y se separaron en alícuotas de 2 millones de células por cada tubo. Las células de cada tubo fueron estimuladas con 500 ng/mL de LPS (cat. L8274 Sigma-Aldrich, St. Louis, E.U.) o antígeno DNP-HSA (27ng/mL) por 0, 15 y 30 min. La reacción se detuvo colocando los tubos en hielo durante 2 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron en una centrifuga Sigma (1-16K, Alemania) a 14,560 g, por 10 min a 4°C. Al término de la centrifugación, las pastillas conteniendo las células fueron procesadas de manera diferencial para la extracción de mRNA total o para western blot.

Western Blot

Después de la centrifugación mencionada en la sección anterior, cada tubo se decantó y se adicionaron 50 µL de buffer Laemmli con ortovanadato de sodio (20 µL) y beta β-mercaptoetanol (20 µL). Una vez que se colocó el Laemmli, las muestras se calentaron a baño maría (57°C) y después se guardaron a -20°C, hasta la realización del western blot. Las proteínas con buffer de Laemmli se separaron en un gel SDS-PAGE 10%, que se corrió a 85 V, 400 mAp por 2 horas. Posteriormente, se realizó una electrotransferencia en una membrana de fluoruro de polivinilideno PVDF (cat. IPVH00010 Immobilon-P, Millipore, Massachusetts), el sándwich de transferencia se ensambló de acuerdo al protocolo de Invitrogen y se usó un buffer de transferencia frío. La transferencia se realizó a 25 V, 400 mAp por 35 min. Después, la membrana se bloqueó con leche al 5% por 1 hora. Pasado el tiempo de bloqueo, se realizaron tres lavados de 10 min cada uno, con TBS-T 1X, pH 8.3 y se colocó el anticuerpo primario durante toda la noche, a 4°C, en agitación. Para eliminar el anticuerpo primario se realizaron tres lavados con TBS-T y se adicionó un anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP), durante una hora, a temperatura ambiente

en agitación. Para eliminar el anticuerpo secundario se realizaron tres lavados con TBS-T, posteriormente se colocó una solución para la reacción de quimioluminiscencia (cat. WBKLSO100 Immobilion Millipore, Massachusetts, E.U.) y las membranas se expusieron a placas de rayos X (cat. 8225526 Carestream, Nueva York, E.U.) de 1 a 5 minutos.

RT-PCR de Punto Final

Después de la estimulación celular, la pastilla se resuspendió en 500 μ L de TRI-reagent (cat. T9424 Sigma-Aldrich, St. Louis, E.U.). Posteriormente, las células con TRI-reagent se resuspendieron y se adicionaron 100 μ L de cloroformo y se centrifugaron a 28,538 x g, por 10 min a 4°C. Después se tomó la fase acuosa y se le adicionaron 3 μ L de glicógeno y 250 μ L de isopropanol, se dejó precipitar a temperatura ambiente durante 10 min y se centrifugó a 28,538 g, 10 min a 4°C. Las muestras se decantaron y se adicionaron 500 μ L de etanol/DEPC al 75% y se centrifugaron a 28,538 g, 10 min a 4°C. El sobrenadante se retiró, para secar la pastilla por 10 min. A la pastilla se le añadió 7.5 μ L de RNA-secure (Ambion) y se incubó a 60°C durante 15 min. Posteriormente, las muestras se leyeron en un nanodrop Thermo scientific (260/280 nm) para cuantificar el RNA. La síntesis de cDNA se realizó con un kit de Thermo Scientific (cat. K1622, Massachusetts, E.U.), donde se colocó a cada muestra 1 μ L de oligo, 1.5 μ g de RNA y agua/DEPC hasta ajustar un volumen de 12 μ L y se incubaron a 65°C durante 5 min. Después se agregaron 4 μ L buffer de reacción 5X, 1 μ L de inhibidor de RNasa, 2 μ L de dNTP 10 mM y 1 μ L de transcriptasa reversa, para cada muestra y se incubó a 42°C durante 60 min. La reacción se detuvo calentado las muestras a 70°C durante 10 min. Para finalizar la síntesis de cDNA se adicionó 130 μ L de agua/DEPEC y se almacenó a -20°C. Para la amplificación del mRNA se agregaron a cada muestra 4 μ L de cDNA, 20.2 μ L de la mezcla maestra que contiene 2.5 μ L de buffer PCR 10X con MgCl₂ (cat. 11271 318-001 Roche, Basilea, Suiza), 0.5 μ L de dNTP 10 mM (R-0192 Thermo Scientific, Massachusetts, E.U.), 0.2 μ L de Taq Polimerasa (E-P0402 Thermo Scientific, Massachusetts, E.U.), 17 μ L de agua DEPC, 1 μ L de oligo sentido y 1 μ L de oligo antisentido. Los oligos utilizados para cada uno de los genes se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Oligos utilizados para cada uno de los genes.

Citocina	Secuencia de oligos	Referencias
TNF- α	Sentido 5' TTC-TGT-CTA-CTG-AAC-TTC-GGG-GTG-ATC-GGT-CC 3' Antisentido 5' GTA-TGA-GAT-AGC-AAA-TCG-GCT-GAC-GGT-GTG-GG 3'	Fransen <i>et al.</i> , 1985
IL-2	Sentido 5' TTC-AAG-CTC-CAC-TTC-AAG-CTC-TAC-AGC-GGA-AG 3' Antisentido 5' GAC-AGA-AGG-CTA-TCC-ATC-TCC-TCA-GAA-AGT-CC 3'	Kashima <i>et al.</i> , 1985
IL-4	Sentido 5' CCA-GCT-AGT-TGT-CAT-CCT-GCT-CTT-CTT-TCT-CG 3' Antisentido 5' CAG-TGA-TGT-GGA-CTT-GGA-CTC-ATT-CAT-GGT-GC 3'	Otsuka <i>et al.</i> , 1987
IL-6	Sentido 5' ATG-AAG-TTC-CTC-TCT-GCA-AGA-GAC-T 3' Antisentido 5' CAC-TAG-GTT-GCC-GAG-TAG-ATC-TC 3'	Renett <i>et al.</i> , 1990
IFN- β	Sentido 5' CTG-GCT-TCC-ATC-ATG-AAC-AA 3' Antientido 5' CAT-TTC-CGA-ATG-TTC-GTC-CT 3'	Kuga <i>et al.</i> , 1989
CCL2	Sentido 5' ACT-CAA-GCC-AGC-TCT-CTC-TT 3' Antisentido 5' TTC-CTT-CTT-GGG-GTC-AGC-AC 3'	Rollins <i>et al.</i> , 1988
GAPDH	Sentido 5' TGA-AGG-TCG-GTG-TGA-ACG-GAT-TTG-GC 3' Antisentido 5' CAT-GTA-GGC-CAT-GAG-GTC-CAC-CAC 3'	Adebanjo <i>et al.</i> , 1998

Las condiciones de amplificación fueron: 94°C (5 min), desnaturalización 94°C (1 min), alineación 60°C (2 min) y extensión 72°C (4 min). El número de ciclos para cada citocina fue de 30 para TNF- α , IL-2, IL-3, IL-4, IFN β y de 25 ciclos para IL-6 y CCL2.

Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa-TBE 1X al 2% y visualizados por tinción con bromuro de etidio en un equipo Bio-Imaging Systems y con el programa GelCapture. Para el análisis densitométrico de las bandas se usó el programa GelQuantExpress.

Lavados peritoneales y obtención de células para RT-PCR

A los ratones se les inyectó intraperitonealmente LPS (1mg/Kg), se dejaron por tres horas, posteriormente se sacrificaron con CO₂. Se les inyectó 1.5 mL de solución salina, intraperitonealmente, después se realizaron masajes en el abdomen y por último se extrajo líquido peritoneal con una jeringa. El líquido se centrifugó a 10,000 g por 5 min a 4°C. Después se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en TRI-reagent y se continuó con el protocolo para extracción de RNA.

Análisis Estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm error estándar. Las diferencias se analizaron mediante un análisis de varianza de dos vías. Una $p < 0.05$ se consideró significativa.

RESULTADOS

Antes de proceder a estimular a las células con LPS, se comprobó por RT-PCR que las CCs provenientes de ratones TLR4^{-/-} no expresarán ese receptor en condiciones basales, ni después de la exposición a 500 ng/mL de LPS de *Escherichia coli* por distintos periodos (Figura 20).

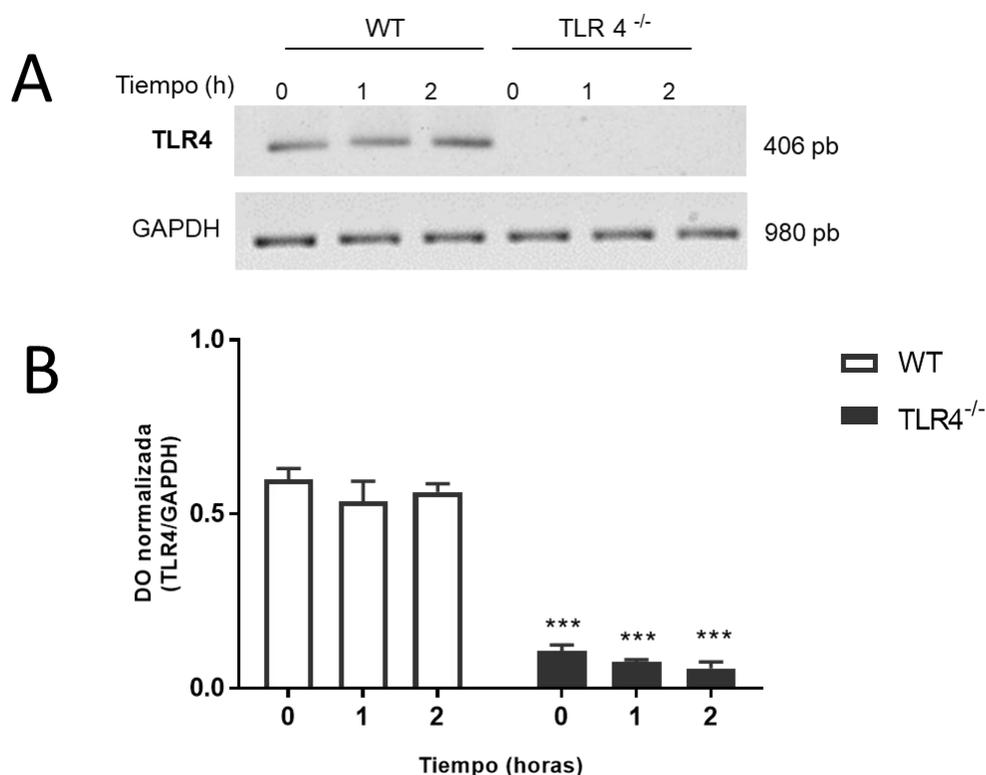


Figura 20. Expresión del receptor TLR4 por RT-PCR punto final. Se tomaron 2 millones de células WT y TLR4^{-/-} por cada condición y se estimularon con LPS (500 ng/mL) durante 0, 1 y 2 horas a 37°. (A) Gel de agarosa con los productos obtenidos de RT-PCR. (B) Análisis densitométrico de cada condición. Los datos se normalizaron contra GAPDH y se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM), de tres experimentos realizados de manera independiente con cultivos distintos. ANOVA de dos vías, post hoc Tukey *** $p < 0.001$ respecto al WT.

Debido a que existen diferentes vías de señalización activadas por el LPS, se decidió estudiar primero, aquellas que llevan a la síntesis de citocinas pro-inflamatorias con la participación de las proteínas adaptadoras MyD88 y TIRAP, tales como TNF- α , IL-6 y CCL2 (Gay *et al.*, 2014, Aldapa *et al.*, 2019).

Cuando se analizó la producción del mRNA de TNF- α , se encontró que las BMMCs derivadas de ratones WT producen el mRNA de esta citocina en respuesta al LPS, presentando un aumento en su expresión después de una hora de estimulación (Medina *et al.*, 2010). De manera inesperada, las células TLR4^{-/-} también expresaron TNF- α después de ser estimuladas con LPS (Figura 21), pero el aumento en su expresión fue dos horas posteriores a la estimulación. Al comparar ambos tipos de células: se observó menor expresión del mRNA de TNF- α , en células TR4^{-/-} una hora después del estímulo, respecto a las células WT. Como control positivo se utilizó IgE antígeno (27 ng/mL), durante dos horas, ya que se sabe que el IgE antígeno estimula al receptor Fc ϵ RI activando cascadas de señalización que llevan a la síntesis de citocinas como TNF- α , IL-6, CCL2, IL-4, IL-2 entre otras (Sommergruber *et al.*, 2011).

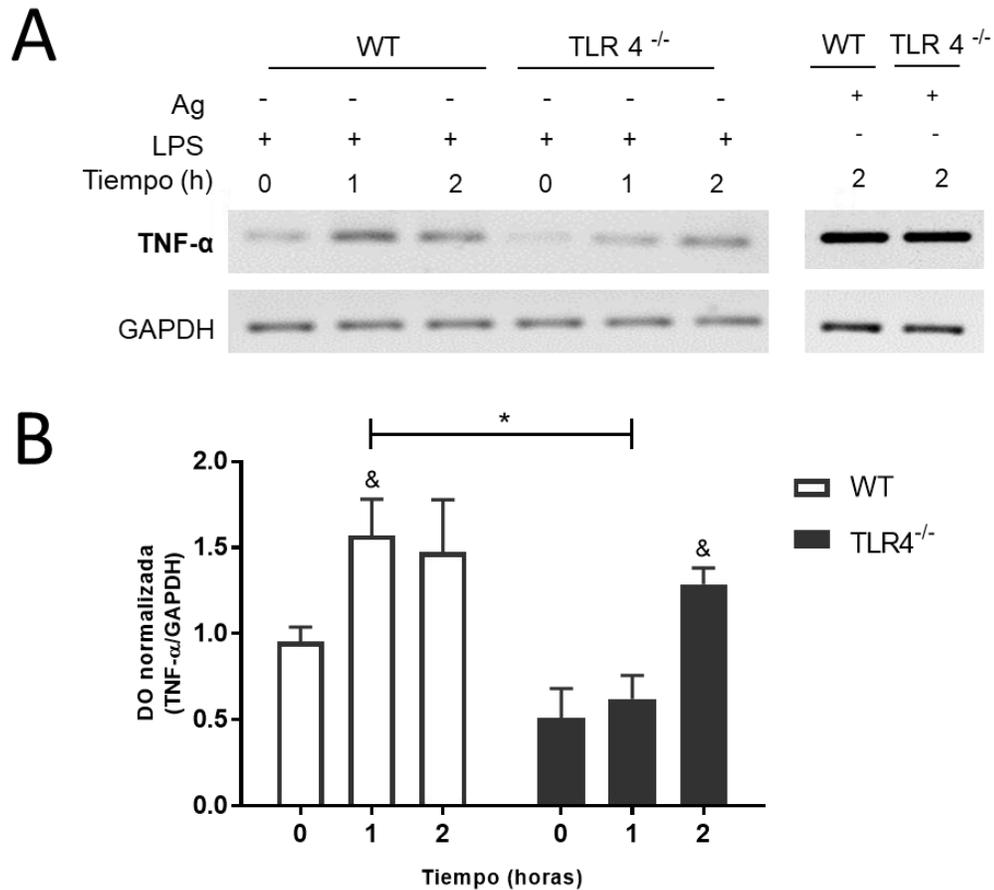


Figura 21. Inducción de la expresión del mRNA de TNF- α por LPS en ausencia del receptor TLR4. Se tomaron 2 millones de células por condición y se estimularon con LPS (500 ng/mL) a las 0, 1 y 2 horas a 37° en células WT y TLR4^{-/-}, como control positivo se utilizaron complejos de IgE/antígeno (27 ng/mL). (A) Gel de agarosa con los productos obtenidos de RT-PCR. (B) Análisis densitométrico de cada condición. Los datos se normalizaron contra GAPDH y se expresan como \pm SEM de 4 experimentos realizados de manera independiente, con cultivos distintos. ANOVA de dos vías, post hoc Tukey * $P < 0.05$ respecto al grupo WT, & $P < 0.05$ respecto al tiempo 0.

Cuando se analizó la producción del mRNA de IL-6 en respuesta al LPS se observó que en ambos tipos celulares: WT y TLR4^{-/-} la expresión del mRNA aumentó dos horas después de la estimulación con LPS. Como control positivo se utilizó un estímulo con complejos de IgE/antígeno (27 ng/mL), durante dos horas, para estimular al Fc ϵ R1 (Figura 22).

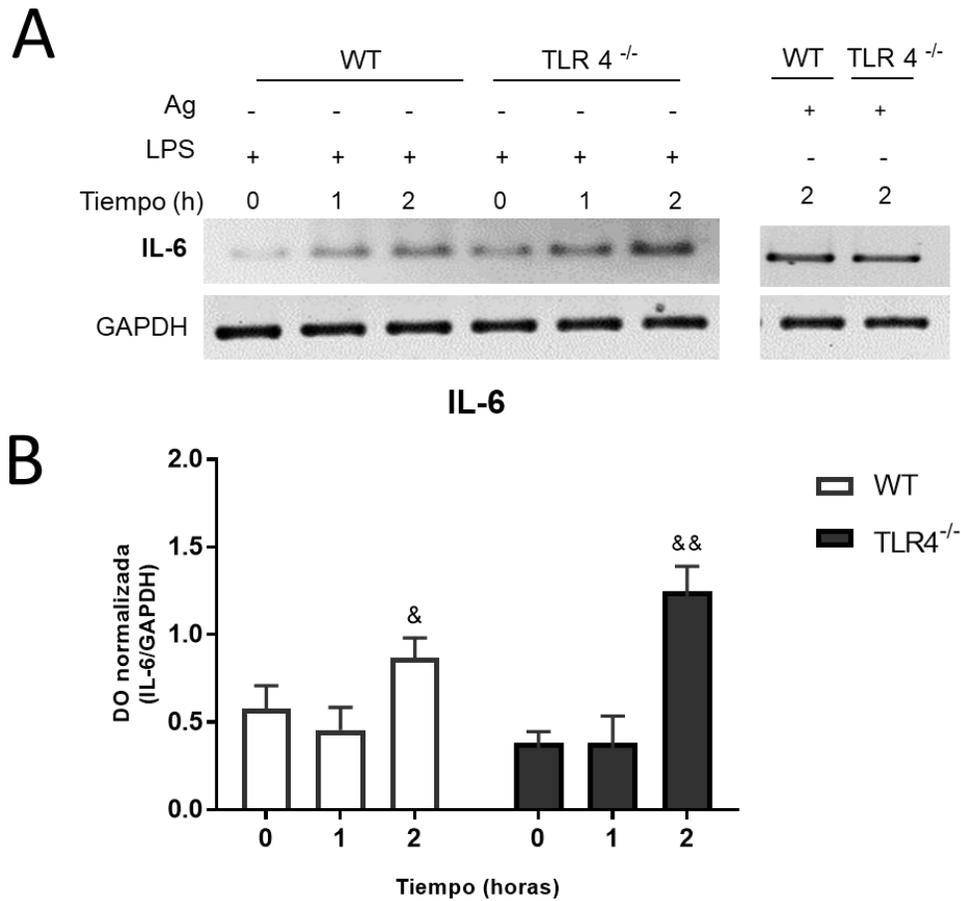


Figura 22. Inducción de la expresión del mRNA de IL-6 por LPS en ausencia del receptor TLR4. Se tomaron 2 millones de células por punto y se estimularon con LPS (500 ng/mL) a las 0, 1 y 2 horas a 37° en células WT y TLR4^{-/-}, como control positivo se utilizaron complejos de IgE/antígeno (27 ng/mL), durante dos horas. (A) Gel de agarosa con los productos obtenidos de RT-PCR. (B) Análisis densitométrico de cada condición. Los datos se normalizaron contra GAPDH y se expresan como \pm SEM de 5 experimentos realizados de manera independiente, con cultivos distintos. ANOVA de dos vías, post hoc Tukey && $P < 0.01$ respecto al tiempo 0.

El mRNA de la citocina CCL2 también se expresó en las células WT y TLR4^{-/-} en respuesta al LPS y se mantuvo en niveles basales todo el curso temporal. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 23) en la cantidad de mRNA entre los dos tipos de células. Como control positivo se utilizó un estímulo con el complejo IgE antígeno (27 ng/mL), por dos horas.

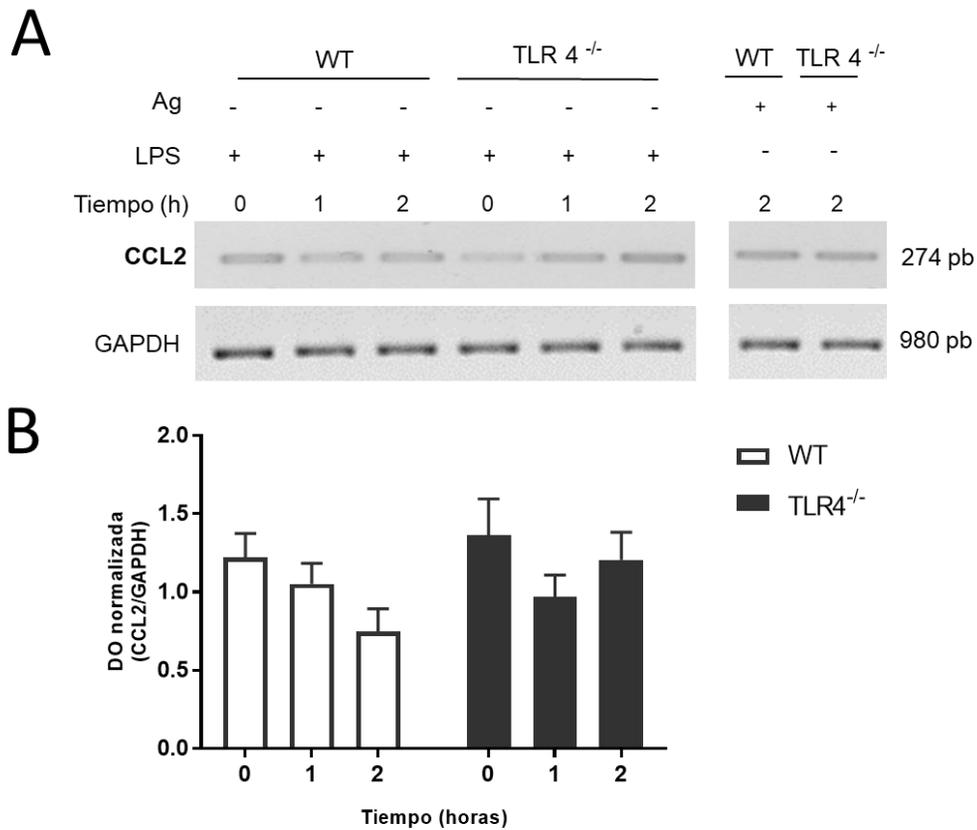


Figura 23. Expresión del mRNA de CCL2 por LPS en ausencia del receptor TLR4. Se tomaron 2 millones de células por punto, se dieron retos de LPS (500 ng/mL) a las 0, 1 y 2 horas a 37° en células WT y TLR4^{-/-}, como control positivo se utilizó IgE antígeno (27 ng/mL), por dos horas. (A) Gel de agarosa con los productos obtenidos de RT-PCR. (B) Análisis densitométrico de cada condición. Los datos se normalizaron contra GAPDH y se expresan como \pm SEM de 5 experimentos realizados de manera independiente, con cultivos distintos. ANOVA de dos vías.

La vía activada por CD14 promueve la síntesis de las citocinas IL-2, así como de IL-4 en células dendríticas (Zanoni y Granucci, 2017), motivo por el que decidimos determinar las concentraciones o la expresión de ambas citocinas en respuesta al LPS, en células con y sin el receptor TLR4. La Figura 24 muestra que el patrón de expresión del mRNA de la citocina IL-4 en ambos tipos celulares fue similar, tanto en células WT como en TLR4^{-/-} la expresión del mRNA de la IL-4 aumentó una hora después del reto con LPS. El mRNA de la IL-2 no se expresó en respuesta al LPS ni en células WT, ni en células TLR4^{-/-}. Como control positivo se utilizó un estímulo con el complejo

IgE/antígeno (27 ng/mL) por dos horas (Figura 25).

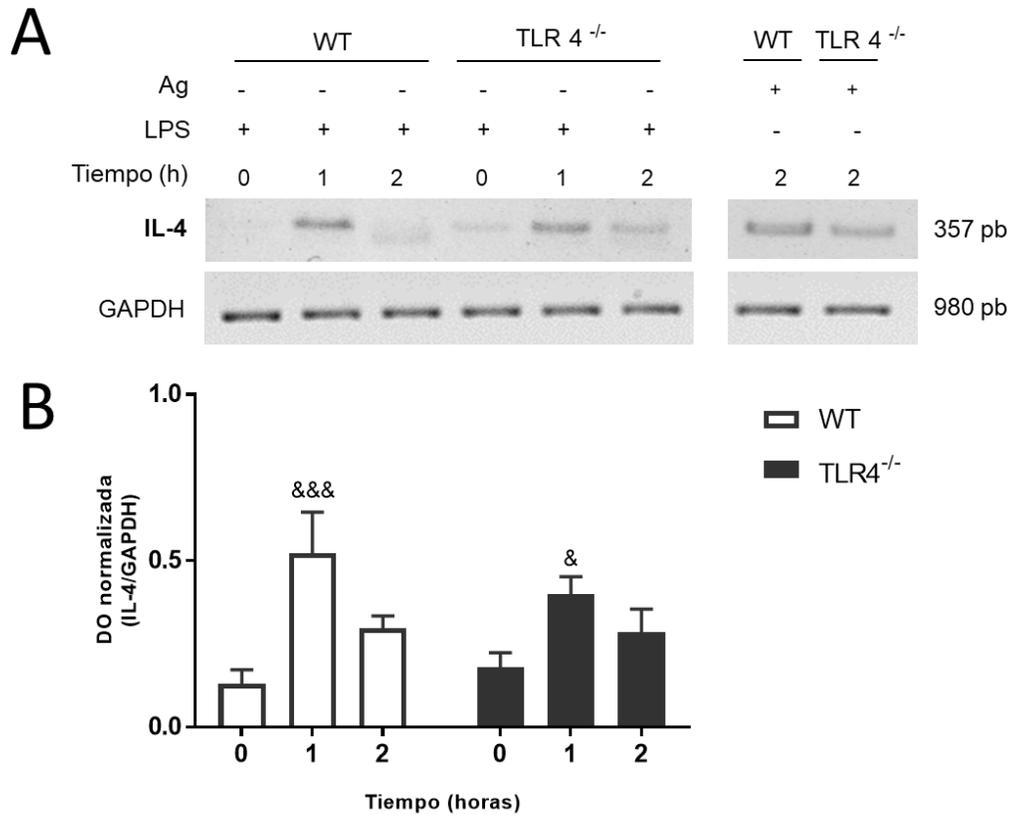


Figura 24. Inducción de la expresión del mRNA de IL-4 por LPS en ausencia del receptor TLR4. Se tomaron 2 millones de células por punto y se estimularon con LPS (500 ng/mL) a las 0, 1 y 2 horas a 37° en células WT y TLR4^{-/-}, como control positivo se utilizó IgE antígeno (27 ng/mL), por dos horas. (A) Gel de agarosa con los productos obtenidos de RT-PCR. (B) Análisis densitométrico de cada condición. Los datos se normalizaron contra GAPDH y se expresan como + SEM de 4 experimentos realizados de manera independiente, con cultivos distintos. ANOVA de dos vías, post hoc Tukey & $P < 0.05$ respecto al tiempo 0.

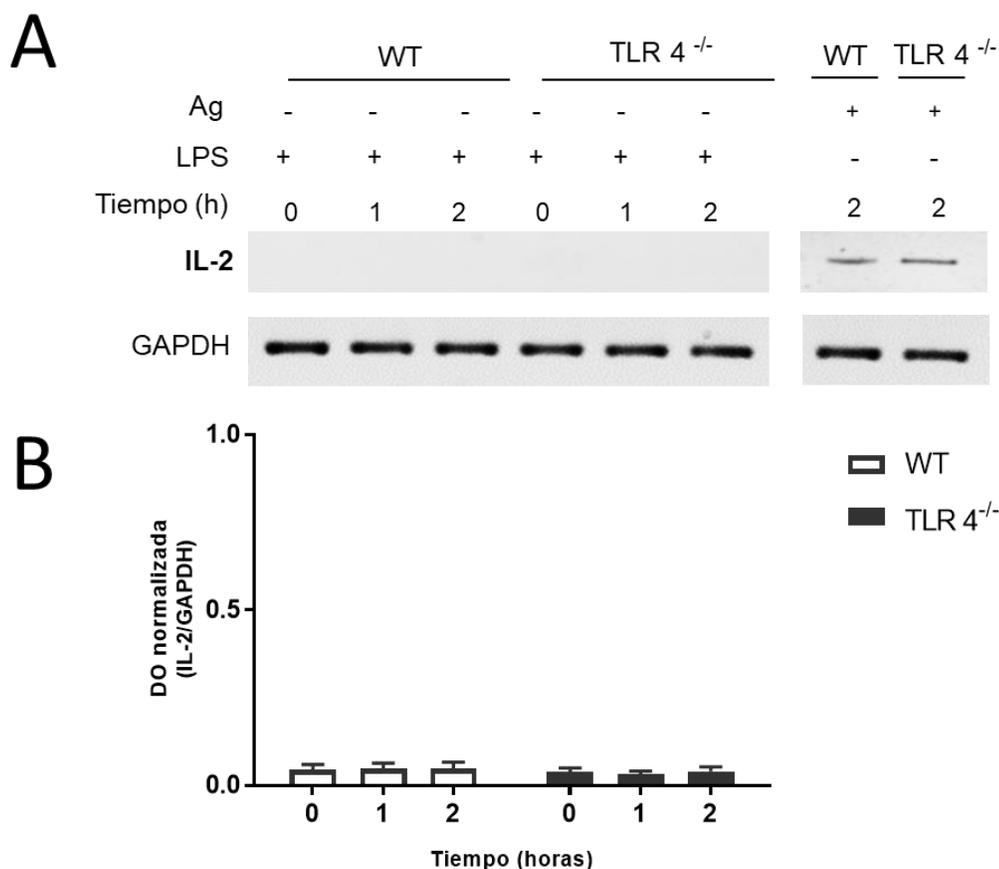


Figura 25. Ausencia de expresión del mRNA de IL-2 por LPS en BMMCs. Se tomaron 2 millones de células por punto y se estimularon con LPS (500 ng/mL) a las 0, 1 y 2 horas a 37° en células WT y TLR4^{-/-}, como control positivo se utilizó IgE antígeno (27 ng/mL) por dos horas. (A) Gel de agarosa con los productos obtenidos de RT-PCR. (B) Análisis densitométrico de cada condición. Los datos se normalizaron contra GAPDH y se expresan como + SEM de 5 experimentos realizados de manera independiente, con cultivos distintos. ANOVA de dos vías.

Para evaluar si se activa la vía endocítica de TRIF-TRAM, se determinó el mRNA de la citocina INF- β , ya que al activar dicha vía se produce INF- β . Encontramos que dicha citocina no se expresa en BMMCs provenientes de ratones WT ni en ratones TLR4^{-/-} (Figura 26). En un principio utilizamos como control positivo el complejo IgE/antígeno (27 ng/mL) por dos horas, sin embargo, no hubo producción del mRNA de INF- β . Para saber si los oligos estaban funcionando adecuadamente decidimos cambiar de control positivo, así que se realizaron lavados intraperitoneales. Primero se dio el estímulo con

LPS (1mg/Kg) intraperitonealmente, después de 3 horas el ratón se sacrificó y se realizó el lavado peritoneal. Del lavado se extrajo el RNA y se realizó la RT-PCR.

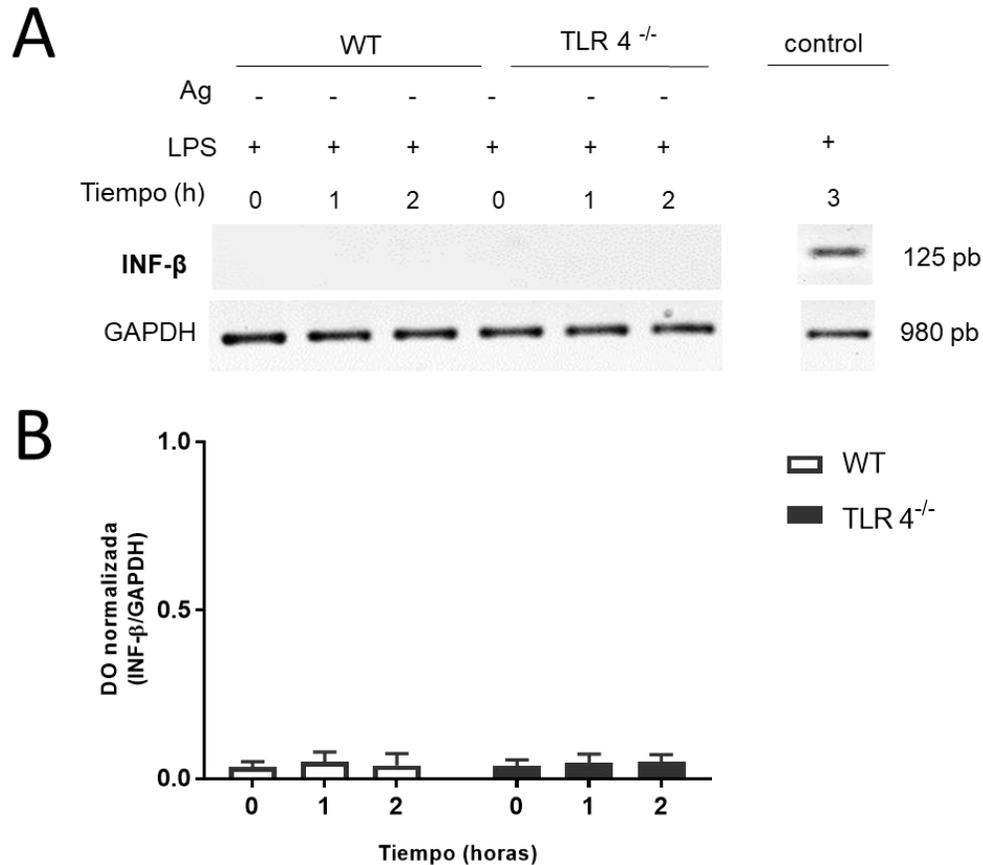


Figura 26. Ausencia de expresión del mRNA de INF-β por LPS. Se tomaron 2 millones de células por punto y se estimularon con LPS (500 ng/mL) a las 0, 1 y 2 horas a 37° en células WT y TLR4^{-/-}, para el control positivo se realizaron lavados intraperitoneales, tras una estimulación con LPS (1mg/Kg) por 3 horas. (A) Gel de agarosa con los productos obtenidos de RT-PCR. (B) Análisis densitométrico de cada condición. Los datos se normalizaron contra GAPDH y se expresan como + SEM de 3 experimentos realizados de manera independiente, con cultivos distintos.

Por otro lado, se decidió analizar la activación de proteínas río abajo de la vía de señalización del receptor TLR4, como las MAPKs (Figura 12). Las MAPKs que se analizaron fueron p38 y ERK 1/2.

En la figura 27 puede observarse que no hay inducción en la fosforilación de la MAPK p38 en células WT. En células TLR4^{-/-} los niveles basales de fosforilación son significativamente mayor que en células WT. Como control positivo se utilizó un estímulo con el complejo IgE antígeno (27 ng/mL) durante dos horas.

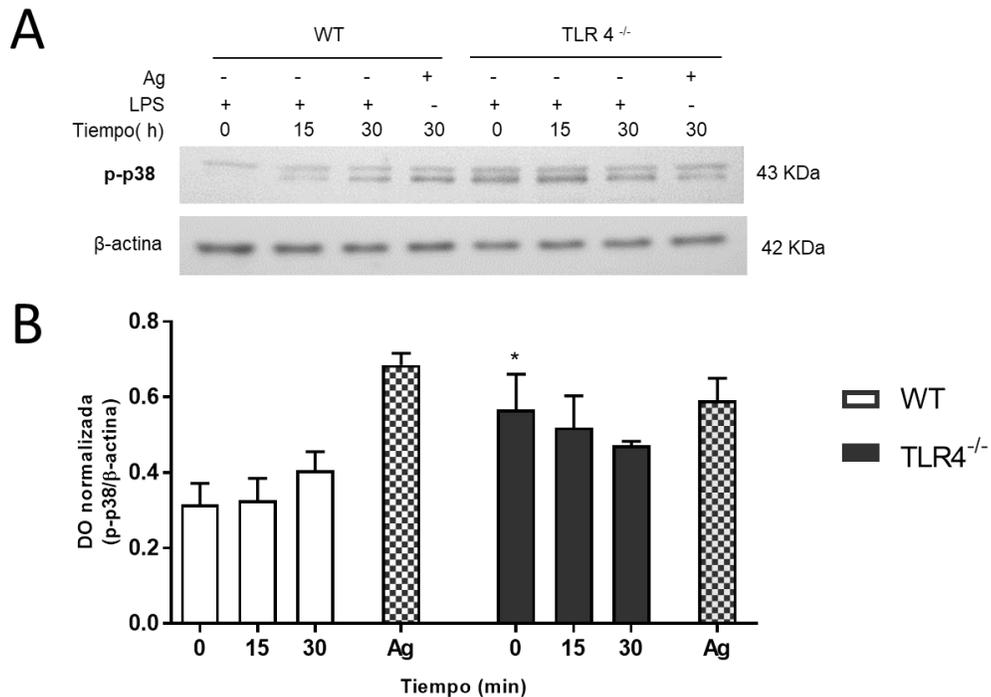


Figura 27. Inducción de la fosforilación de p38 en ausencia del receptor TLR4. Se tomaron 2 millones de células por punto a 37° en células, se estimularon con LPS (500 ng/mL) a los 0, 15 y 30 min, WT y TLR4^{-/-}, como control positivo se utilizó IgE antígeno (27 ng/mL) durante dos horas. (A) Western blot del curso temporal de fosforilación de p-38. (B) Análisis densitométrico de cada condición. Los datos se normalizaron contra β-actina y se expresan como \pm SEM de 3 experimentos realizados de manera independiente, con cultivos distintos. ANOVA de dos vías, post hoc Tukey, * $p < 0.05$ respecto al tiempo 0.

La fosforilación de la MAPK ERK 1/2 en células WT, en respuesta al LPS no se indujo. En células TLR4^{-/-} los niveles basales de fosforilación son altos y disminuyen a los 15 y 30 min después de la estimulación con LPS. Los niveles de fosforilación de ERK 1/2 en células TLR4^{-/-} son mayores con respecto a las células WT. Como control positivo se utilizó un estímulo con el complejo IgE antígeno (27 ng/mL) durante dos horas (Figura 28).

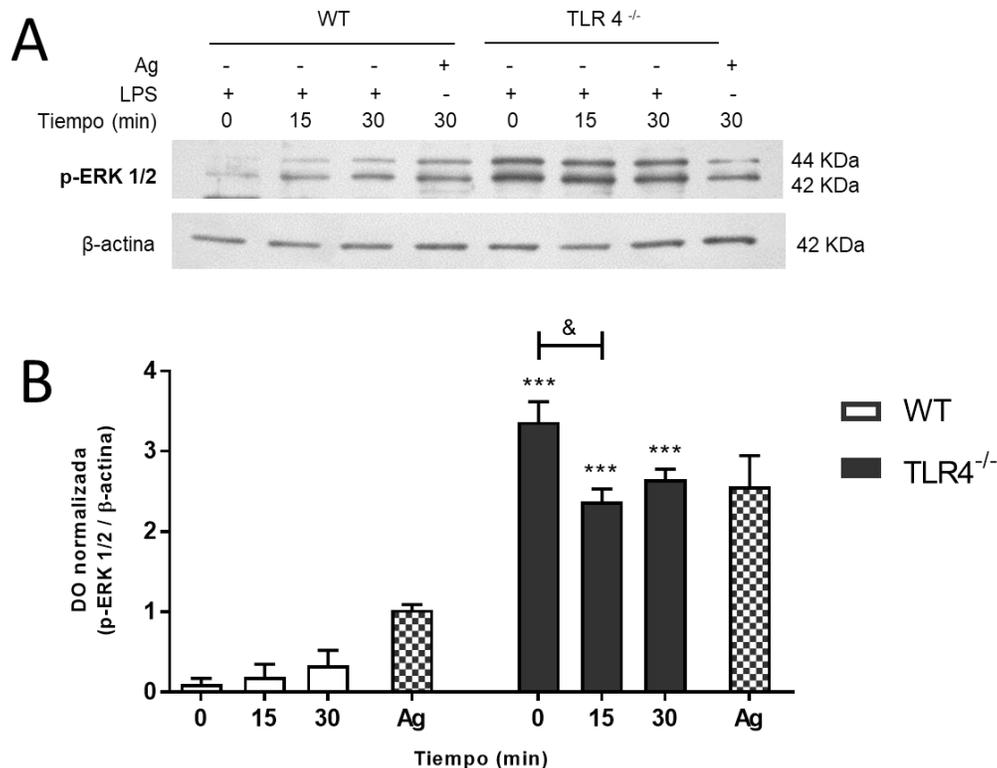


Figura 28. Inducción de la fosforilación de ERK por LPS en ausencia del receptor TLR4. Se tomaron 2 millones de células por punto a 37° en células, se estimularon con LPS (500 ng/mL) a los 0, 15 y 30 min, WT y TLR4^{-/-}, como control positivo se utilizó IgE antígeno (27 ng/mL) por dos horas. (A) Western blot del curso temporal de fosforilación de p-ERK. (B) Análisis densitométrico de cada condición. Los datos se normalizaron contra β-actina y se expresan como + SEM de 3 experimentos realizados de manera independiente, con cultivos distintos. ANOVA de dos vías, post hoc Tukey *** p <0.001 respecto al grupo WT, & p <0.05 respecto al tiempo 0.

Finalmente, debido a que algunas citocinas inducidas por el LPS como la IL-4 dependen de la movilización de calcio intracelular, decidimos averiguar si la adición de LPS a las BMDCs derivadas de ratones WT y TLR4^{-/-} inducía la fosforilación de la PKC-α, una isoforma de la PKC cuya activación depende de la producción de diacilglicerol y de la salida de calcio del retículo endoplásmico. Como puede verse en la Figura 29, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la fosforilación de la PKC-α en ambos tipos celulares.

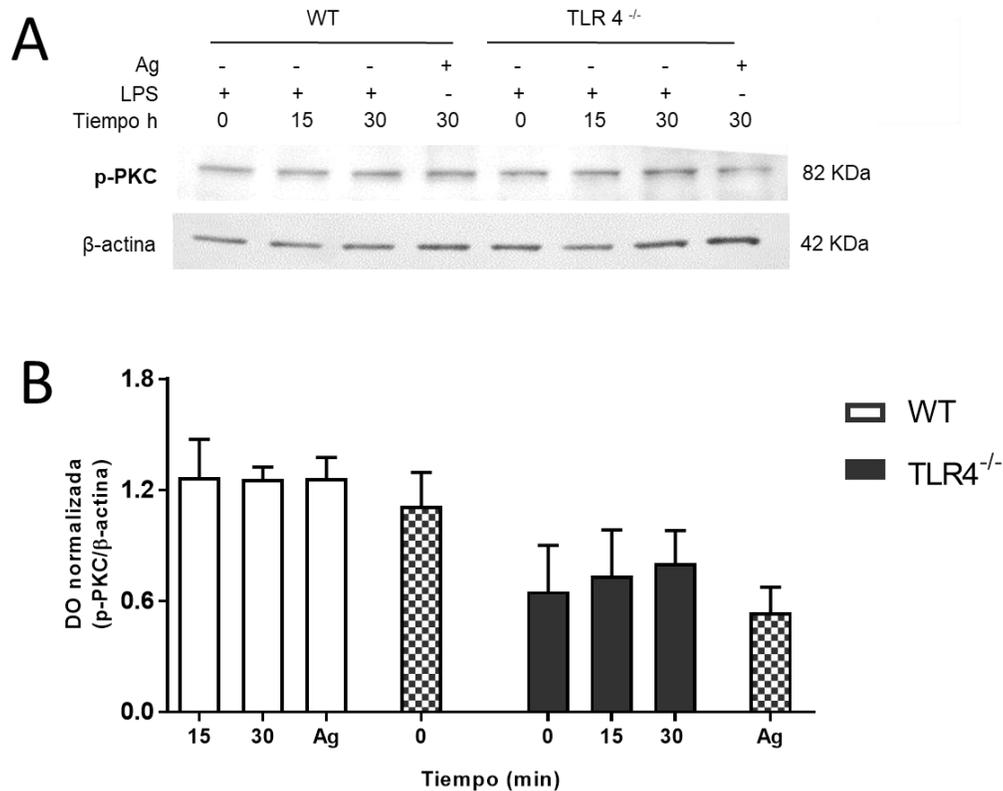


Figura 29. Fosforilación de PKC- α por LPS en BMMCs. Se tomaron 2 millones de células por punto a 37° en células, se dieron retos de LPS (500 ng/mL) a los 0, 15 y 30 min, WT y TLR4^{-/-}, como control positivo se utilizó IgE antígeno (27 ng/mL) por dos horas. (A) Western blot del curso temporal de fosforilación de p-PKC- α . (B) Análisis densitométrico de cada condición. Los datos se normalizaron contra β -actina y se expresan como + SEM de 3 experimentos realizados de manera independiente, con cultivos distintos. ANOVA de dos vías.

Resumen de Resultados

Respuestas observadas tras la adición de LPS a BMMCs derivadas de ratones WT y TLR4^{-/-}.

mRNA de las Citocinas	WT	TLR4 ^{-/-}
CCL2	No se induce	No se induce
IL-2	No se induce	No se induce
INF-β	No se induce	No se induce
TNF-α	Se induce a 1h	Se induce a las 2 h
IL-6	Se induce a las 2 h	Se induce a las 2 h
IL-4	Se induce a 1h	Se induce a 1h

Proteína fosforilada	WT	Basal	TLR4 ^{-/-}	Basal
PKC-α	No se observó cambios	Alto	No se observó cambios	Alto
p38	No se observó cambios	Bajo	No se observó cambios	Alto
ERK 1/2	No se observó cambios	Bajo	Disminuye a los 15 min	Alto

DISCUSIÓN

Los organismos multicelulares, y en especial los mamíferos, están expuestos a múltiples infecciones, por lo que han tenido que desarrollar receptores que reconozcan microorganismos patógenos y activen vías de señalización que eliminen a dichos patógenos. Los mamíferos cuentan con receptores PRR especializados en el reconocimiento de patógenos, dentro de los cuales se encuentran los receptores TLR4. Esos receptores son capaces de discriminar entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, ya que su ligando es el LPS la molécula que forma la pared celular de las bacterias Gram negativas y que en su mayoría son patógenas. Las vías de señalización canónicas del receptor TLR4 llevan a la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (Alvestegui *et al.*, 2019, Gil, *et al.*, 2016).

Debido a la importancia del reconocimiento de esos patógenos, se han estudiado y descubierto diversos mecanismos alternos de respuesta a los compuestos bacterianos, como el LPS. Dentro de estos mecanismos independientes del receptor TLR4 se encuentra, por ejemplo, el mecanismo mediado por el co-receptor CD14, del cual se ha encontrado que activa a la PLC- γ e induce la producción de las citocinas IL-2 e IL-4, en células dendríticas (Zanoni y Granucci 2013).

En este proyecto analizamos la participación del LPS bacteriano en las respuestas generadas por el receptor TLR4 en células cebadas, evaluando la síntesis de los mRNA de varias citocinas y la fosforilación de MAPKs, estimulada por LPS, en células WT y en células carentes del receptor TLR4. En las siguientes secciones se presentan los principales aspectos a discutir con base en los resultados obtenidos.

1. Los mRNA de las Citocinas que No se Inducen con LPS en CCs de Ratones WT

La estimulación de las BMMCs con LPS no produjo ningún cambio en la síntesis del mRNA de la quimiocina CCL2. Esta molécula tiene como función principal el reclutamiento de monocitos, macrófagos y leucocitos en respuesta a un estímulo inflamatorio. Niveles elevados de CCL2 están implicados en el desarrollo de

inflamación en el tejido adiposo, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 y neuroinflamación (Bose y Cho, 2013; Sartipy y Loskutoff, 2003). En el 2018, Akther reportó que el LPS induce producción de la citocina CCL2 mediante los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, en macrófagos. Nuestros resultados mostraron que la expresión de mRNA de CCL2 en células WT es basal, pero no se induce un aumento por LPS. Esto sugiere que en las células cebadas el LPS no induce aumento ni disminución de la expresión del mRNA de CCL2.

Del mismo modo, la estimulación con LPS no produjo un aumento en el mRNA de la IL-2. La citocina IL-2 actúa de forma autócrina y parácrina como factor estimulante del crecimiento de células NK y linfocitos B, estimulado, en estos últimos, la producción de anticuerpos. También potencia la función fagocítica de neutrófilos y macrófagos, además de activar a los linfocitos T. La síntesis de IL-2 se lleva a cabo mediante la vía de las MAPKs (Curfs *et al.*, 1997), sin embargo, una vía alterna por la cual también involucra la inducción del factor de transcripción NFAT, que se activa por el incremento en la concentración de calcio, ya sea proveniente del IP3 (Zanoni y Granucci, 2013) o de canales de calcio de la membrana plasmática. En la Figura 25 podemos observar que tanto en células WT como TLR4^{-/-} no hay expresión basal del mRNA de la IL-2 y tampoco su inducción por LPS. En la literatura encontramos que las CCs sintetizan IL-2 en respuesta a estímulos del complejo IgE/antígeno, vía el Fc ϵ RI (Hershko *et al.*, 2011). Sin embargo, hasta la fecha, no hay reportes que indiquen que el LPS induce la síntesis de la citocina IL-2.

El LPS tampoco indujo la producción del RNAm de INF- β . La citocina INF- β interfiere con la replicación viral, evitando la proliferación de virus (Boxx y Cheng, 2016). Esta citocina se produce gracias a la internalización de los receptores TLR4 y CD14 en macrófagos, células dendríticas y células epiteliales. Siendo CD14 quien activa la vía de TRIF-TRAM, que lleva a la activación y traslocación del factor de transcripción IRF3 al núcleo, para inducir la producción de mRNA del INF- β (Chung *et al.*, 2018; Shim *et al.*, 2015; Black *et al.* 2013). Román (2017) encontró que en BMMCs sí hay internalización de los receptores TLR4 y CD14 en BMMCs en respuesta a LPS. Sin

embargo, nuestros resultados muestran que tanto en células WT como en TLR4^{-/-} prácticamente no se expresa el mRNA del INF-β, ni se induce por LPS. Es decir que a pesar de la internalización de ambos receptores no hay activación de la vía TRIF-TRAM. Dietrich y colaboradores (2010), así como Keck (2011) reportaron que las CCs no producen INF-β debido a que las BMDCs no expresan grandes cantidades de los adaptadores TRIF y TRAM, lo que concuerda con nuestros resultados. No obstante, comprobamos que nuestra metodología de detección del mRNA del IFN-β sí funciona, ya que logramos la amplificación de éste en lavados peritoneales de ratones inyectados con LPS por tres horas.

2. Los mRNA de las Citocinas que se Indujeron por LPS en Presencia y Ausencia del TLR4

Nuestras observaciones muestran que el mRNA de TNF-α se induce en respuesta al LPS tanto en células WT como en células TLR4^{-/-}. La función principal de esta citocina es reclutar neutrófilos y macrófagos a la zona de infección. También activa vías de señalización que llevan a la muerte celular (Varadarajaloul *et al.*, 2003). Se sabe que el control de la cantidad del mRNA para TNF-α en las células cebadas es un proceso complejo que depende de la estabilización del mRNA existente en el citoplasma, así como de la síntesis de novo que ocurre en el núcleo celular gracias a la activación de factores de transcripción.

El mRNA de TNF-α en las CCs se degrada rápidamente en ausencia de estímulos específicos. Sin embargo, en respuesta a varios ligandos, éste se estabiliza gracias a la rápida activación de la proteína HuR que se une al extremo 3' mRNA. La activación de HuR depende de eventos muy tempranos en la señalización de los receptores membranales y ocurre antes de la traslocación nuclear de factores de transcripción. Así pues, la cantidad del mRNA de TNF-α presente después de la activación del receptor TLR4 depende, a tiempos tempranos, de la estabilización del mRNA que se expresa constitutivamente y, a tiempos largos, de la activación de factores de transcripción.

Nuestros resultados mostraron que la expresión del mRNA de TNF- α en células WT aumentó una hora después del estímulo con LPS, mientras que las células TLR4^{-/-} presentaron el incremento dos horas después del estímulo. Este corrimiento en el curso temporal puede deberse a la falta de activación de proteínas HuR en el mRNA de células TLR4^{-/-}, que pudo ocasionar que el mRNA de TNF- α fuera susceptible a degradación por endonucleasas, disminuyendo el tiempo de vida media del mensajero y, por tanto, previniendo su acumulación a tiempos cortos (Figura 13, Cai *et al.*, 2019).

Otra explicación podría ser que, en ausencia del receptor TLR4, se activaran solamente algunos factores de transcripción y que tales factores fueran los responsables de la síntesis más tardía del mRNA. Por ejemplo, se sabe que en linfocitos T y en macrófagos, la transcripción del gen de TNF- α es controlada por diversos factores de transcripción, los cuales se activan dependiendo del tiempo y del estímulo. Los principales estímulos que se han estudiado son los ionóforos de calcio y los virus. Los estímulos con ionóforos de calcio producen la activación del factor de transcripción NFAT, el cual se une a seis sitios presentes en el promotor del gen para TNF- α , mientras que los estímulos por virus llevan a la activación de factores de transcripción dependientes de las MAPKs como AP-1, Sp1, Ets, y Elk. Los factores de transcripción, una vez unidos a los sitios promotores correspondientes, inician la síntesis del mRNA (Tsytsykova, 2002; Falvo, 2010). En distintas células inmunes, el estímulo con LPS activa a factores de transcripción que están río abajo de las MAPKs. Sin embargo, en monocitos de murinos, se ha visto que el LPS causa influjos de calcio (Tsai, 2000) que podrían activar al factor NFAT y llevar a la producción del mRNA de TNF- α . Tal vez en BMMCs el proceso de transcripción se da de forma similar que en monocitos murinos, donde además de activarse los factores de transcripción de las MAPKs, se activa NFAT por influjos de calcio. Nuestros resultados muestran que en células TLR4^{-/-}, el aumento en la expresión del mRNA de TNF- α presentó un corrimiento de una hora, tal vez porque en este tipo celular, el LPS no induce influjos de calcio y, por tanto, la síntesis sólo depende de los factores de transcripción de las MAPKs y por eso se observa el aumento del mRNA hasta dos horas después.

El LPS indujo la producción del mRNA de IL-4 en presencia y ausencia del receptor TLR4. La citocina IL-4 regula la proliferación, diferenciación y apoptosis en múltiples tipos celulares como CCs, células dendríticas, endoteliales, musculares y neuronales (Zamorano *et al.*, 2003). En linfocitos B promueve la proliferación, así como la síntesis de inmunoglobulinas IgE. En linfocitos T induce el fenotipo TH2; los linfocitos TH2 son de gran importancia para la eliminación de microorganismos extracelulares y parásitos (Curfs *et al.*, 1997).

Nuestros experimentos mostraron que la expresión del mRNA de la IL-4 en células WT presentó un nivel basal que aumentó una hora después del estímulo con LPS y lo mismo sucedió en células TLR4^{-/-}. Estos resultados nos indican que la síntesis de IL-4 posiblemente no depende del receptor TLR4, ya que hay producción de mRNA en ambos tipos celulares y el aumento producido por el LPS se da a la misma hora. Podríamos pensar que la vía que se activó fue la vía dependiente de CD14, ya que se ha visto que, en células dendríticas, esta vía lleva a la activación de la PLC- γ y a la producción de DAG. Sin embargo, al medir la fosforilación de PKC no encontramos un aumento en la fosforilación de esa proteína en ninguno de los dos tipos celulares, lo que indica que esta vía no se activó. Otros autores, como Kong (2016), han reportado la síntesis de IL-4 mediante la vía de ERK. Por lo tanto, en nuestro modelo, IL-4 pareciera sintetizarse por la vía de la MAPK ERK, que se encontró activa en ausencia del receptor TLR4.

El LPS produjo la síntesis del mRNA de IL-6 en ausencia del receptor TLR4. La citocina IL-6 promueve la diferenciación y maduración de neutrófilos, macrófagos, linfocitos T y B y estimula la producción de inmunoglobulinas por parte de las células B (Curfs *et al.*, 1997). El mRNA de IL-6 produce por activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1. En la Figura 22 podemos observar que la expresión del mRNA de IL-6 en células cebadas WT presentó un nivel basal que aumenta dos horas después del estímulo con LPS. Lo mismo ocurrió en células TLR4^{-/-}, lo que nos indica que la producción de IL-6 posiblemente no depende del receptor TLR4. La síntesis del mRNA para esta citocina pudiera depender también de ERK o de otras vías de señalización

que sí se encontraron activas en células cebadas carentes del receptor TLR4. Futuras investigaciones deberán centrarse en describir el mecanismo involucrado.

3. Activación de las MAPKs

La MAPK p38 no mostró cambios en la fosforilación en células WT. En células TLR4^{-/-} se observó una fosforilación basal alta que se mantuvo durante todo el curso temporal. Esto nos hace pensar que p38 en células TLR4^{-/-} está siempre fosforilado. Por otra parte, la MAPK ERK 1/2 también se encontró activa en ausencia de estimulación, en células carentes del receptor TLR4, no así en células WT.

Los resultados con las MAPKs fueron inesperados debido a que, por lo general en casi en todas las células, los niveles basales de fosforilación de las MAPKs son muy bajos y se mantienen en estado inactivo hasta que un estímulo lleva a un aumento en la fosforilación. Nuestros resultados indican que, en células cebadas, la presencia del TLR4 mantiene a las MAPK en un estado inactivo, y que su ausencia promueve su fosforilación. Por otro lado, nuestros resultados sugieren que la activación basal de las MAPKs p38 y ERK 1/2 en células TLR4^{-/-} no ocasiona un incremento en la síntesis de los mRNA de las citocinas TNF- α , IL-6 y CCL2. Sería muy interesante estudiar, a futuro, los mecanismos que utiliza el receptor TLR4 para mantener inactivas a las MAPKs y sus efectos en la síntesis de citocinas pro-inflamatorias en este tipo celular.

4. Vías Activadas por el LPS e Independientes del TLR4

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que existen vías funcionales activadas por el LPS en células cebadas, que llevan a la síntesis de citocinas pro-inflamatorias de manera independiente del receptor TLR4. Este hallazgo es importante porque, por primera vez, se tiene evidencia de que este tipo celular tiene vías que no involucran al receptor TLR4 en el reconocimiento y respuesta a ligandos bacterianos.

Una de estas vías alternas es la mediada por los receptores NOD. Se sabe que, en macrófagos, el LPS ingresa al interior de la célula y es reconocido por los receptores NOD (Dietrich *et al.*, 2010). Estos receptores también pueden inducir la expresión de

genes de citocinas pro-inflamatorias a través del factor de transcripción NF- κ B (Platnich y Muruve, 2019). Sin embargo Dietrich y colaboradores (2010), reportaron que el LPS no se internaliza en CCs, por lo que tal vez este mecanismo no es el que se está activando en BMMCs TLR4^{-/-}.

Otra vía que no involucra al receptor TLR4 es la activada por el ácido fólico. Se sabe que la ameba *Dictyostelium discoideum* (un eucarionte sencillo), presenta receptores para ácido fólico en su superficie celular, llamados fAR1 que le ayudan a detectar bacterias. El ácido fólico es secretado por las bacterias y una vez que es reconocido por el receptor fAR1 se activan vías de señalización para fagocitarlas. Las vías que se activan son PI3K y ERK2. Los receptores de ácido fólico también pueden reconocer al LPS y activar las mismas vías de señalización (Pan *et al.*, 2018) para fagocitar. Sin embargo los fAR1 sólo se han reportado en amibas.

Finalmente, la vía que no involucra al receptor TLR4 más conocida de respuesta al LPS es la activada por el co-receptor CD14, el cual ocasiona la activación de Syk y la PLC γ 2. La activación de la PLC γ 2 incrementa los niveles de calcio intracelular mediante el IP3, que activan al factor de transcripción NFAT, para inducir la síntesis del mRNA de las citocinas IL-2 y la IL-4 en células dendríticas (Zanoni y Granucci, 2013). Debido a que las BMMCs utilizadas en la presente tesis expresan el co-receptor CD14 en grandes cantidades, y que este co-receptor se transloca a la región perinuclear de las células en respuesta al LPS, es posible hipotetizar que es la vía de CD14 es la que se esté activando en ausencia del receptor TLR4 y esté ocasionando la síntesis de citocinas pro-inflamatorias en células TLR4^{-/-}. Experimentos bloqueando la síntesis de CD14 con siRNAs específicos podrían ayudar a evaluar la participación de esa molécula en las respuestas de las células cebadas al LPS bacteriano.

El presente trabajo sugiere la existencia de vías de señalización activadas por el LPS, independientes al receptor TLR4 en células cebadas, que llevan a la inflamación. Los principales hallazgos y las posibles vías de señalización activadas por el LPS en células cebadas pueden verse en la Figura 30, donde el LPS favorece la síntesis de

las citocinas TNF- α , IL-6, IL-4. El TNF- α se sintetiza posiblemente mediante la vía de MyD88 que lleva a la activación de NF- κ B el cual tiene un sitio de unión en el promotor de TNF- α . También se activa la vía de la MAPK ERK 1/2 que induce la migración del factor de transcripción AP-1 al núcleo y este tiene seis sitios de unión en el promotor de TNF- α , favoreciendo su síntesis. En estas células no hay influjos de calcio ante estímulos con LPS, por lo que no se activa el factor de transcripción NFAT y por lo tanto la síntesis de TNF- α se lleva a cabo mediante la vía de las MAPKs. La IL-6 también es producida por la vía de las MAPKs. Como no encontramos aumento en la fosforilación de PKC, la IL-4 se produce entonces por la vía de las MAPKs. Las células TLR4^{-/-}, también tienen receptores NOD, sin embargo, el LPS no se internaliza. No se sabe si las BMMCs cuentan con receptores fAR1, así que el receptor que puede estar activando las vías en ausencia del TLR4 es CD14.

Célula TLR4^{-/-}

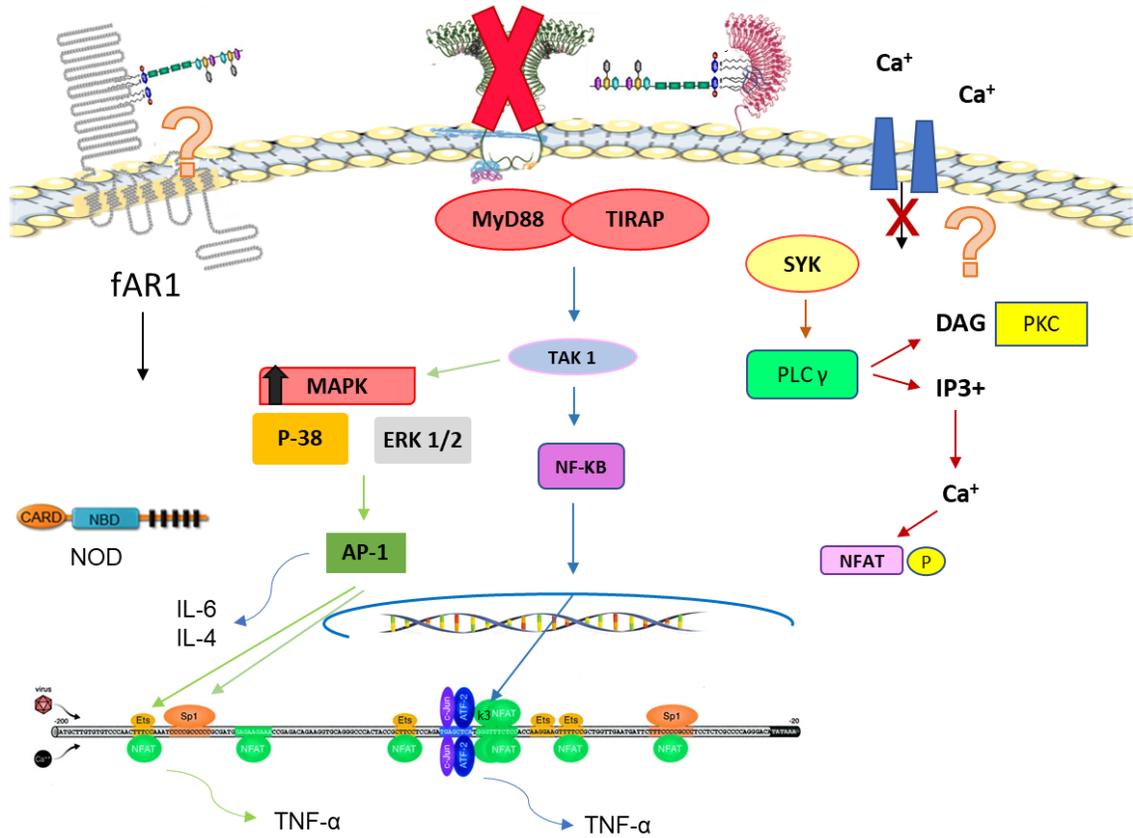


Figura 30. Vías de señalización activadas en ausencia del receptor TLR4. Las vías de señalización que se activan en ausencia del TLR4 son MyD88 y la vía de la MAPK ERK 1/2, estas vías inducen la traslocación de los factores de transcripción NF-Kb y AP-1 al núcleo, respectivamente, lo que favorece la producción de las citocinas TNF- α , IL-6, IL-4. El receptor responsable de la activación de las vías de señalización puede ser CD14.

CONCLUSIÓN

El LPS bacteriano es capaz de activar vías de señalización que llevan a la síntesis de citocinas pro-inflamatorias en ausencia del receptor TLR4 en células cebadas.

PERSPECTIVAS

- Inhibir a CD14 por medio de siRNAs y medir nuevamente citocinas inducidas en ausencia del TLR4.
- Investigar si las BMMC tienen receptores a fAR1 y si participan en el reconocimiento del LPS.
- Evaluar la fosforilación de IKK y de NF- κ B, para asegurar que la vía activa es MyD88- NF- κ B.
- Evaluar la fosforilación de la MAPK JNK para completar la caracterización de las MAPK en células TLR4 ^{-/-}.
- Investigar el mecanismo mediante el cual la presencia del TLR4 disminuye la fosforilación basal de las MAPK p38 y ERK 1/2 en BMMCs.

REFERENCIAS

Abbas A, Lichtman A, Pillai S. 2015. Cellular and molecular immunology. 8ed. Elsevier. Canada. 535p.

Adebanjo A, Moonga S, Yamate T, Sun L, Minkin C, Abe E, Zaidi M. 1998. Mode of action of interleukin-6 on mature osteoclasts. Novel interactions with extracellular Ca²⁺ sensing in the regulation of osteoclastic bone resorption. *J Cell Biol* 142(5):1347-56.

Agier J, Żelechowska P, Kozłowska E, Brzezińska E. 2016. Expression of surface and intracellular Toll-like receptors by mature mast cells. *Cent Eur J Immunol* 41(4):333-33.

Akira S, Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499–511

Akhter N, Hasan A, Shenouda S, Wilson A, Kochumon S, Ali S, Tuomilehto J, Sindhu S, Rasheed A. 2018. TLR4/MyD88 -mediated CCL2 production by lipopolysaccharide (endotoxin): Implications for metabolic inflammation. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 17:77–84.

Aldapa G, Pastelín R, Isibasi A, Moreno M, López C. 2016. Modulation of immune response by bacterial lipopolysaccharides. *Rev Alerg Mex* 63(3):293-302.

Alvestegui A, Olivares M, Muñoz E, Smith R, Nataro J, Ruiz F, Farfan M. 2019. TLR4 participates in the inflammatory response induced by the aaf/ii fimbriae from enteroaggregative *Escherichia coli* on intestinal epithelial cells. *Front Cell Infect Microbiol* 3; 9:143.

Ashley J, Soman A. 2013. Innate immunity and its regulation by mast cells. *The Journal of Immunology* 190(9):4458–63.

Avila M, Gonzalez C. 2011. Signaling through Toll-like receptor 4 and mast cell-dependent innate immunity responses. *UBMBLife* 63(10):873-80.

Banchereau J, Steinman R. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* (392): 245–52.

Bbolewska E, Witczak P, Pietrzak A, Brzezinska E. 2012. Different potency of bacterial antigens TLR2 and TLR4 ligands in stimulating mature mast cells to cysteinyl leukotriene synthesis. *Microbiol Immunol* 56:183–190

Beutler B, Rietschel E. 2003. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature reviews immunology* 3: 169-176.

Black K, Collins S, Hagan R, Hamblin M, Chan Y, Hallowell R, Powell J, Horton M.

2013. Hyaluronan fragments induce IFN β via a novel TLR4-TRIF-TBK1-IRF3-dependent pathway. *Journal of Inflammation* 10(23):1-9.

Brito J, Ruggero P, Condino A. 2013. Toll-Like Receptors' Pathway Disturbances are Associated with Increased Susceptibility to Infections in Humans. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 61:6 427–443.

Bose S, Cho J. 2013. Role of chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in neurodegenerative diseases. *Arch Pharm Res* 36(9):1039-50.

Boxx G, Cheng G. 2016. The Roles of Type I Interferon in Bacterial Infection. *Cell Host Microbe* 19(6):760-9

Cai J, Chen J, Guo H, Pan Y, Zhang Y, Zhao W, Li X, Li Y. 2019. Recombinant fimbriae protein of *Porphyromonas gingivalis* induces an inflammatory response via the TLR4/NF- κ B signaling pathway in human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Mol Med* 43(3):1430-1440.

Castanier C, Garcin D, Vazquez A, Arnoult D. 2010. Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway. *EMBO Rep.* 11(2):133–138.

Catalog R&D System. Minneapolis, 1995. 8. Cytokine Bulletin. Spring 1995. R&D System. Minneapolis, 1995.

Chen J, Szodoray P, Zeher M. 2016. Toll-Like Receptor Pathways in Autoimmune Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 50(1):1-17.

Chirumbolo S, Bjørklund G, Sboarina A, Vella A. 2018. The role of basophils as innate immune regulatory cells in allergy and immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother* 14(4):815-831.

Chung H, Koh W, Kim W, Shin J, Lee J, Lee S, Ha I. 2018. The Anti-Inflammatory Effects of Shinbaro3 Is Mediated by Downregulation of the TLR4 Signalling Pathway in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophages. *Mediators Inflamm* 1-14.

Cochet F, Peri F. 2017. The Role of Carbohydrates in the Lipopolysaccharide (LPS)/Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Signalling. *Int J Mol Sci* 11: 1-16

Corridoni D, Simmons A. 2017. Innate immune receptor for cross-presentation: the expanding role NLRs. *Journal Molecular Immunology* 1-5.

Curfs H, Meis F, Hoogkamp A. 1997. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev* 10:742-780

Czerkies M, Kwiatkowska K. 2014. Toll-like receptors and their contribution to innate immunity: focus on Tlr4 activation by lipopolysaccharide. *Advances In Cell Biology* 4(1):1–23.

Dellibovi T, Altan N. 2016. Cloud storage for endosomes. *The EMBO Journal* 35(16): 1724–25.

De Nardo D. 2015. Toll-like receptors: activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine* 74(2):181–89.

Dietrich N, Rohdeb M, Geffersc R, Kroger A, Hansjorg H, Weissa S, Gekaraa N. 2010. Mast cells elicit proinflammatory but not type I interferon responses upon activation of TLRs by bacteria. *PNAS* 107(19):8748-8753.

Dinarello A, 2009. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Rev. Immunol* 27:519–50.

Dokun A, Chu D, Yang L, Bendelac A, Yokoyama W. Analysis of in situ NK cell responses during viral infection. 2001. *J Immunol* 167(9):5286-93

Eberle J, Voehringer D. 2016. Role of basophils in protective immunity to parasitic infections. *Semin Immunopathol* 38(5):605-1.

Echtenacher B, Mannel D, Hultner L. 1996. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 381(6577):75-77.

Falvo J, Tsytsykova V, Goldfeld E. 2010. Transcriptional control of the TNF gene. *Curr Dir Autoimmun* 11:27-60.

Ferraro B, Leoni G, Hinkel R, Ormanns S, Paulin N, Ortega A, Viola J, de Jong R, Bongiovanni D, Bozoglu T, Mass S, D'Amico M, Kessler T, Zeller T, Hristov M, Reutelingsperger C, Sager H, Döring Y, Nahrendorf M, Kuppatt C, Soehnlein O. 2019. Pro-Angiogenic Macrophage Phenotype to Promote Myocardial Repair 73(23):2990-300.

Fransen L, Mueller R, Marmenout A, Tavernier J, Van der J, Kawashima E, Chollet A, Tizard R, Heuverswyn H, Vliet A, Ruyschaert R, Fiers W. 1985. Molecular cloning of mouse tumour necrosis factor cDNA and its eukaryotic expression. *Nucleic Acids Res* 13(12):4417-4429.

Fric J, Zelante T, Wong A, Mertes A, Yu H, Ricciardi P. 2018. Review article NFAT control of innate immunity. *Blood Journal* 120(7):1380–90.

Frossi B, Mion F, Tripodo C, Colombo M, Pucillo. 2017. Rheostatic functions of mast cells in the control of innate and adaptive immune responses. *Trends in Immunology* 38(9):648–56.

Frossi B, Mion F, Sibilano R, Danelli L, Pucillo C. 2018. Is it time for a new classification of mast cells? what do we know about mast cell heterogeneity?. *Immunological Reviews* 283:35-43.

Gartner L, J Hiatt. 2008. *Text atlas of Histology*. MacGraw-Hill, 3^a ed.

Gentek R, Ghigo C, Hoeffel G, Chen J, Ginhoux F, Bajénoff M. 2018. Hemogenic Endothelial Fate Mapping Reveals Dual Developmental Origin of Mast Cells. *Immunity* 48, 1160–1171.

Gharagozloo M, Gris K, Mahvelati T, Amrani A, Lukens J, Gris D. 2018. NLR-Dependent Regulation of Inflammation in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*. 8: 1-18.

Giese M, Hind L, Huttenlocher A. 2019. Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. *Blood* 133(20):2159-2167.

Gil I, Muciano C, Yáñez A, Gozalbo D. 2016. Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections. *Frontiers in Bioscience Landmark* 21:278-302.

Gomes A, Leiteb N, Viater L, Rodrigues R, Kapp A, Milano G, Lazarottob L, Larissa Rosa L, Furtado L. 2019. Association between Toll-likereceptors (TLR) and NOD-likereceptor (NLR) polymorphisms and lipid and glucose metabolism. *Gene* 685:211–22.

Gorskaya Y, Tukhvatulin A, Nesterenko V. 2017. NLR2 and TLR3, TLR4, TLR5 ligands, injected in vivo, improve after 1 h the efficiency of cloning and proliferative activity of bone marrow multipotent stromal cells and reduce the content of osteogenic multipotent stromal cells in cba mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 163(3):356-36.

Grassart A, Cheng A, Hae S, Zhan F, Zenzer N, Feng Y. 2014. Actin and dynamin2 dynamics and interplay during clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Biol* 1-15.

Hemanshu P, Sidney Shaw, Shi Xi, Abraham D, Baker D, Tsui J. 2012. Toll-Like Receptors in Ischaemia and Its Potential Role in the Pathophysiology of Muscle Damage in Critical Limb Ischaemia. *Cardiology Research and Practice* 12:1-13.

Hochdörfer T, Tiedje Ch, Stumpo D, Blackshear P, Gaestel M, Huber M. 2013. LPS-induced production of TNF- α and IL-6 in mast cells is dependent on p38 but independent of TTP. *Cellular Signalling* 25:1339-1347.

Hoebe K, Beutler B. 2004. LPS, dsRNA and the interferon bridge to adaptive immune responses: Trif, Tram, and other TIR adaptor proteins. *J Endotoxin Res* 2:130-136.

Huang F, Zhao J, Wang L, Gao C, Liang S, An D, Bai J, Chen Y, Han H, Qin H. (2017). Mir-148a-3p mediates Notch signaling to promote the differentiation and m1 activation of macrophages. *Frontier Immunology* 8:1-13.

Hung W, Ling P, Chien J, Chang S, Tseng. 2016. Disabled-2 is a negative immune regulator of lipopolysaccharide- stimulated Toll-like receptor 4 internalization and signaling. *Nature Publishing Group (September):* 1–14.

Izquierdo L, Abitiu N, Coderch N, Hita B, Merino S, Gavin R, Tomas J, Regue M. 2002. The inner-core lipopolysaccharide biosynthetic waaE gene: function and genetic distribution among some Enterobacteriaceae *Microbiology* 148, 3485–3496.

Jensen B, Falkenchrone S, Skov P. 2014. Measuring histamine and cytokine release from basophils and mast cells. *Methods Mol Biol.*1192:135-45.

Jeoung P, Young K, and Ae Y. 2009. Protein Kinase D1 Is Essential for MyD88-Dependent TLR Signaling Pathway. *J Immunol* 182:10 6316-632.

Kashima N, Nishi C, Fujita, Taki S, Yamada G, Hamuro J, Taniguchi T. 1985. Unique structure of murine interleukin-2 as deduced from cloned cDNAs. *Nature* 313(6001):402-404.

Keck S, Müller I, Fejer G, Savic I, Tchaptchet S, Nielsen J, Galanos C, Huber M, Freudenberg A. 2011. Absence of TRIF signaling in lipopolysaccharide-stimulated murine mast cells. *J Immunol* 186(9):5478-88.

Kong S, Soo B, Gi T, Soo H, Sook J, Woo S, Park C, Chung Y. 2016. Aspirin induces IL-4 production: augmented IL-4 production in aspirin-exacerbated respiratory disease. *Experimental & Molecular Medicine* 48:1-10.

Kubo M. 2018. Mast cells and basophils in allergic inflammation. *Current Opinion in Immunology* 54:74–79.

Kuga T, Fujita T, Taniguchi, T. 1989. Nucleotide sequence of the mouse interferon-beta gene. *Nucleic Acids Res* 17(8):3291.

Lee C, M A, Hidde P. 2012. Accessory molecules for toll-like receptors and their function. *Nature Publishing Group* 12(3):168–79.

Lehrer J, Vigeant K, Tatar L, Valvano M. 2007. Characterization and membrane topology of Escherichia coli weca, a sugar-phosphate transferase initiating the biosynthesis of enterobacterial common antigen and o-antigen lipopolysaccharide *Journal of Functional Bacteriology* 2618–2628.

Li Q, Cherayil B. 2004. Toll-like receptor 4 mutation impairs the macrophage TNFalpha response to peptidoglycan. *Biochem Biophys Res Commun* 325:91–96.

Lipscomb M, Masten B. 2002. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 82(1):97-130.

Liu B, Liu J, Liu K, Li Y, Wang K, Caof H, Cheng Q. 2019. A prognostic signature of five pseudogenes for predicting lower-grade gliomas. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 117:1-8.

Liu Y, Olagnier D, Lin R. 2017. Host and Viral Modulation of RIG-1 Mediated Antiviral Immunity. *Front Immunol* 7(662):1-12.

Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham S. 1996. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* 381(6577):77-80.

Malhotra A, Shanker A. 2011. NK cells: immune cross-talk and therapeutic implications. *Immunotherapy* 3(10):1143-6.

Medina J, Ibarra A, Padilla A, González 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.

Motta V, Soares F, Sun T, Philpott D. 2015. Nod-like receptors: versatile cytosolic Sentinels. *Physiol Rev* 95:149-178.

Murray P, Wynn T. 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11:723-737.

Nakayama H, Nishida K, Otsu K. Macromolecular Degradation Systems and Cardiovascular Aging. *Circ Res* 118(10):1577-92.

Navarro C, Gavara J, Veronica V, Bonanad C, Racugno P, Bayes A, Miñana G, Husser O, Oltra R, Nuñez J, Chorro F1, Bodí D V, Ruiz A. 2018. Characterization and implications of the dynamics of eosinophils in blood and in the infarcted myocardium after coronary reperfusion. *PLoS One* 13(10):1-20.

Netea G, Joosten A, Latz E, Mills H, Natoli G, Stunnenberg G, O'Neill A, Xavier J. 2016. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*. 352(6284):1098-1098-9.

Newton K, Dixit V. 2012. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:1-19.

Nijland R, Hofland T, Strijp J. 2014. Recognition of LPS by TLR4: potential for anti-inflammatory therapies. *Marine Drugs* 4260-4273.

O'Neill L, Bowie A. 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 7:353-364.

Otsuka T, Villaret D, Yokota T, Takebe Y, Lee F, Arai N, Arai K. 1987. Structural analysis of the mouse chromosomal gene encoding interleukin 4 which expresses B cell, T cell and mast cell stimulating activities. *Nucleic Acids Res* 15(1):333-344.

Pan M, Neilson M, Grunfel A, Cruz P, Wen X, Insall R, Jin T. 2018. A G-protein-coupled chemoattractant receptor recognizes lipopolysaccharide for bacterial phagocytosis *PLOS Biol* 16(5):1-20.

Pease J, Williams T. 2018. Eosinophils on trial. *Clin Exp Allergy* 48(5):490-492.

Piras V, Selvarajoo K. 2014. Beyond myd88 and trif pathways in Toll-like receptor signaling. *Frontier In Immunology* 1–3.

Platnich J, Muruve D. 2019. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1-12.

Raghuraman P, Sudan J, Jeeva L, Sudandiradoss C. 2017. Systematic prioritization of functional hotspot in RIG-1 domains using pattern based conventional molecular dynamic simulation. *Life Sciences* 184:58-70.

Rajaiah R, Perkins D, Ireland D, Vogel S. 2015. CD14 dependence of TLR4 endocytosis and TRIF signaling displays ligand specificity and is dissociable in endotoxin tolerance *PNAS* 112(27):8391–8396.

Raulet D. 1996. Recognition events that inhibit and activate natural killer cells. *Curr Opin Immunol* 8(3):372-7.

Ravin K, Loy M. 2015. The eosinophil in infection. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 50(2):214–27.

Renett E, Fuentes L, Fuller M. Cloning and sequence analysis of the cDNA for murine interleukin-6. 1990. *Nucleic Acids Res* 18(21):6455.

Riley J, Malik A, Holohan C, Longley D. 2015. DED or alive: assembly and regulation of the death effector domain complexes. *Cell Death Dis* 6:1-16.

Rios C, Gavara J, Vidal V, Bonanad C, Racugno P, Bayes A, Miñana G, Husser O, Oltra R, Nuñez J, Chorro F, Bodil V. 2018. Characterization and implications of the dynamics of eosinophils in blood and in the infarcted myocardium after coronary reperfusion. *PLOS ONE* 13(10):1–20.

Rivera A, Siracusa M, Yap G, Gause W. 2016. Innate cell communication kick-starts pathogen-specific immunity. *Nature Immunology* 17(4):356–63.

Rollins J, Morrison D, Stiles D. 1988. Cloning and expression of JE, a gene inducible by platelet-derived growth factor and whose product has cytokine-like properties. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85(11):3738-3742.

Román Figueroa Abraham. 2017. Tesis de Maestría Caracterización de las posibles vías de señalización intracelular activadas por LPS en células cebadas. CINVESTAV Unidad Coapa.

Roy S, Karmakar M, Pearlman E. 2014. CD14 mediates Toll-like receptor 4 (TLR4) endocytosis and spleen tyrosine kinase (Syk) and interferon regulatory transcription factor 3 (IRF3) activation in epithelial cells and impairs neutrophil infiltration and *Pseudomonas aeruginosa* killing in vivo. J Biol Chem 289(2):1174-82.

Sartipy P, Loskutoff J. 2003. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. Proc Natl Acad Sci U S A 100(12):7265-70.

Shim D, Heo K, Kim Y, Sim E, Kang T, Choi J, Sim D, Cheong S, Lee S, Bang J, Won H, Lee K. 2015. Anti-Inflammatory Action of an Antimicrobial Model Peptide That Suppresses the TRIF-Dependent Signaling Pathway via Inhibition of Toll-Like Receptor 4 Endocytosis in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages. PLoS ONE 10(5):1-13.

Sommergruber H, Paschinger K, Lain W. 2011. Glycomarkers in parasitic infections and allergy. Biochemical Society Transactions 39(1):360–64.

Steinman R, Banchereau J. 2007. Taking dendritic cells into medicine. Nature 449:419–26.

Steinman R, Witmer M. 1978. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. Proc Natl Acad Sci 75(10):5132–5136.

Sun P, Wang H, He Z, Chen X, Wu Q, Chen W, Sun Z, Weng M, Zhu M, Ma D, Miao C. 2017. Fasting inhibits colorectal cancer growth by reducing M2 polarization of tumor-associated macrophages. Oncotarget 8(43):7464-7469.

Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, Ogawa H. 2002. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. J Clin Invest 109(10):1351-9.

Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Okumura K, Ra C, Ogawa H. 2001. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. J Immunol 167(4):2250-6.

Takeda K, Akira K. 2004. TLR signaling pathways. Seminars in Immunology 16:3-9.

Tsai E, Falvo J, Tsytsykova A, Barczak A, Reimold A, Glimcher L, Fenton M, Gordon D, Dunn I, Goldfeld A. 2000. A lipopolysaccharide-specific enhancer complex involving

Ets, Elk-1, Sp1, and CREB binding protein and p300 is recruited to the tumor necrosis factor alpha promoter in vivo. *Mol Cell Biol* 20(16):6084-94.

Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Kimoto M. 2010. Lipopolysaccharide-binding protein-mediated Toll-like receptor 4 dimerization enables rapid signal transduction against lipopolysaccharide stimulation on membrane-associated CD14-expressing cells. *International Immunology* 22(4):271-280.

Tsukamoto H, Takeuchi S, Kubota K, Kobayashi Y, Kozakai Sao, Ukai I, Shichiku, Ayumi Okubo M, Numasaki M, Kanemitsu Y, Matsumoto Y, Nochi T, Watanabe, Kouichi A, Hisashi T, Yoshihisa. 2018. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein stimulates CD14-dependent Toll-like receptor 4 internalization and LPS-induced TBK1-IKK ϵ -IRF3 axis activation. *Journal of Biological Chemistry* 293(26):10101-10201

Tsytsykova A, Goldfeld A. 2002. Inducer-specific enhanceosome formation controls tumor necrosis factor alpha gene expression in T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 22(8):2620-31

Ullmann N, Bossley C, Fleming L, Silvestri M, Bush A, Saglani S. 2013. Blood eosinophil counts rarely reflect airway eosinophilia in children with severe asthma. *Allergy* 68(3):402-6.

Ulrich B y Rivera J. 2004. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *TRENDS in Immunology* 25(5):266-273.

Varadaradjalou S, Féger F, Thieblemont N, Hamouda NB, Pleau JM, Dy M, Arock M. 2003. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells *Eur. J. Immunol* 33:899–906.

Vargas J, Gea-Banacloche J, Ramon S, Albarran F, Tebas P, Martinez J, Durantez A. 1996. Natural killer cell proliferation and renal disease: a functional and phenotypic study. *Cytometry* 26(2):125-30.

Wang Y, Yang Y, Liu X, Wang N, Cao H, Lu Y, Zhou H, Zheng J. 2012. Inhibition of clathrin/dynamin-dependent internalization interferes with LPS-mediated TRAM/TRIF-dependent signaling pathway. *Cellular Immunology* 274:121–129.

Weber G, Maier S, Zönnchen T, Breucha M, Seidlitz T, Kutschick I, Weitz J. 2015. Analysis of circulating plasmacytoid dendritic cells during the course of sepsis. *Surgery* 158(1):248-54.

Wernersson S, Pejle G. 2014. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nature* 14:478-494.

Wu L, Saxena S, Awaji M, Singh R. 2019. Tumor-Associated Neutrophils in Cancer: Going Pro. *Cancers* 11(564):1-20.

Yang F, Feng C, Zhang X, Lu J, Zhao Y. 2017. The Diverse Biological Functions of Neutrophils, Beyond the Defense Against Infections. *Inflammation* 40(1):311-323.

Yang Y, Lv J, Jiang S, Ma Z, Wang D, Hu W, Deng C, Fan C, Di S, Sun Y, Yi W. 2016. The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation *Cell Death and Disease* 7:1-10.

Yong H, Luo D. 2018. RIG-I-like receptors as novel targets for pan-antivirals and vaccine adjuvants against emerging and re-emerging viral infections. *Frontiers in Immunology* 9:1–9.

Yueh L, Gale M. 2012. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 34(5):680–692.

Zanoni I, Granucci F. 2012. Regulation and dysregulation of innate immunity by NFAT signaling downstream of pattern recognition receptors (PRRs). *European Journal of Immunology* 42:1924–31.

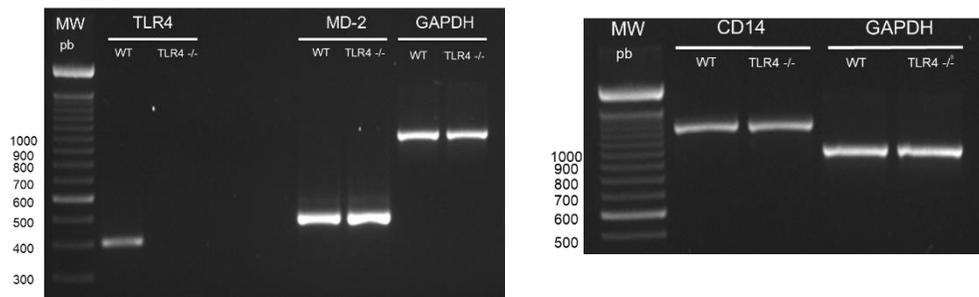
Zanoni I, Granucci F. 2013. Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3:1–6.

Zamorano J, Rivas M, Pérez M. 2003. Interleukin-4: A multifunctional cytokine *Inmunología* 22(2):215-224.

ANEXO 1

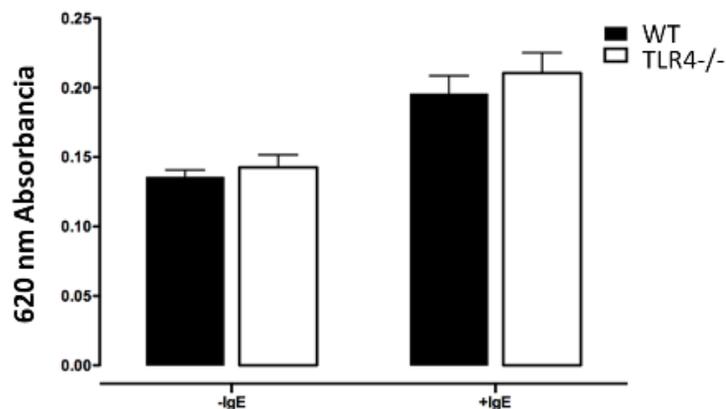
Caracterización de las CCs de Ratones TLR4^{-/-}

Nuestro laboratorio ha realizado algunas pruebas, para determinar características de las células provenientes de los ratones TLR-4^{-/-}. Algunas de las características encontradas por el M. C. Alfredo Ibarra son las siguientes, cuentan con la molécula adaptadora MD-2 y con el correceptor CD14.

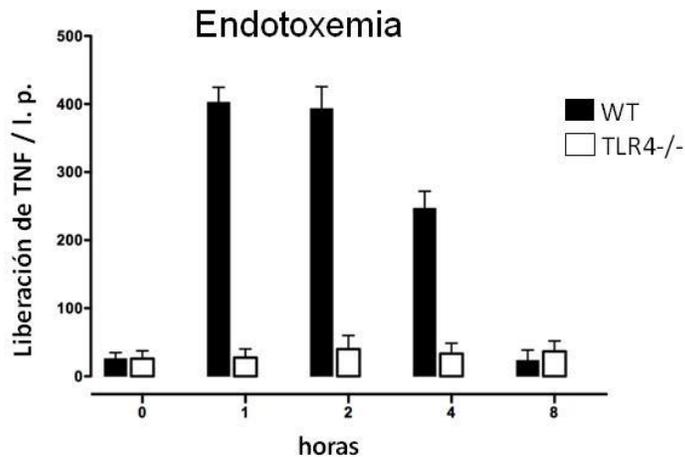


Ensayo de anafilaxia, se inyectó inmunoglobulina IgE en una oreja, posteriormente se inyectó azul de Evans más IgE antígeno en la vena de la cola. El azul de Evans tiñe de azul, donde hay extravasación provocada por la desgranulación de las células cebadas. Las orejas se cortan y se colocan en una solución de digestión y se mide la absorbancia a 620 nm. No se encontraron diferencias en los resultados en ambas cepas de animales WT y TLR-4^{-/-}.

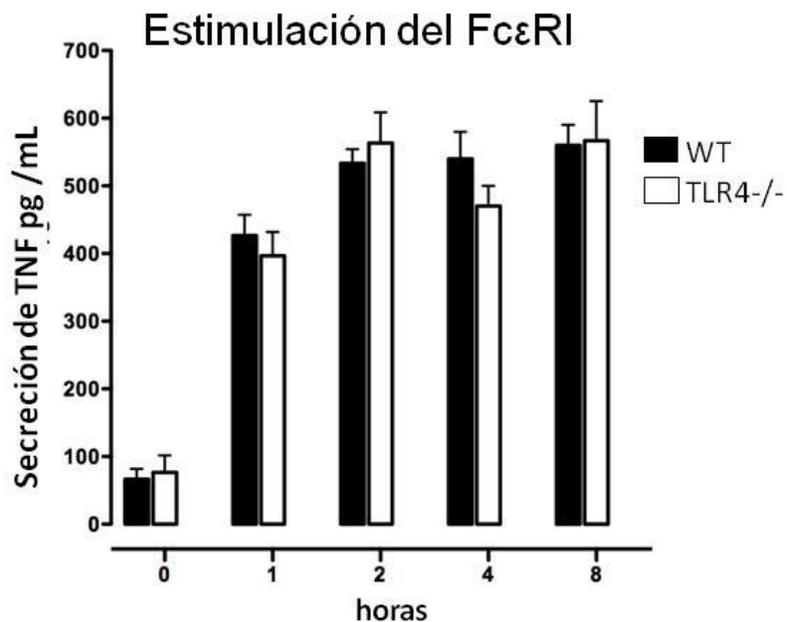
Anafilaxia pasiva cutánea



Ensayo de endotoxemia, se inyectó intraperitonealmente LPS en un curso temporal de 8 horas, posteriormente se inyectó solución salina y se realizó un lavado intraperitoneal, para realizar un Elisa y medir la liberación del TNF. Las células de animales TLR-4^{-/-}, no liberaron TNF en 8 horas.



Ensayo de estimulación del FcεRI, se sensibilizaron células con IgE por 24 horas, se dió un reto con LPS en curso temporal de 8 horas y se midió la liberación de TNF por Elisa. No hay diferencias en la liberación de TNF, en células de animales WT y TLR4^{-/-}.



Tinción de moléculas preformadas, se tiñeron los gránulos de las células cebadas de ratones WT y TLR-4^{-/-}. No hubo diferencias en la presencia de mediadores preformados en los gránulos Tryptasa y TNF.

