



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

**DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA**

**Participación de las proteínas VAMP3 y VAMP8 en la  
secreción de TNF estimulada por la activación del receptor  
TLR-4 en células cebadas**

Tesis que presenta:

**Q.F.B. Deisy Lizbeth Segura Villalobos**

Para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias**

En la especialidad de:

**Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Directoras de tesis:

**Dra. Claudia González Espinosa  
Dra. Elizabeth Sánchez Miranda**

Ciudad de México

Agosto, 2018

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio 11 del Departamento de Farmacobiología del Cinvestav, gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) mediante la beca de maestría con Registro No.**614038** y al financiamiento de los proyectos ANR-Conacyt **188565** y Conacyt **FC-2015-2/1122**.

# DEDICATORIA

*A mi madre...*

*Por su infinito amor que siempre me ha impulsado a seguir adelante.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Claudia González Espinosa por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por la confianza y por todo el apoyo brindado a lo largo de mi maestría.

A la Dra. Elizabeth Sánchez Miranda por los consejos y sugerencias para mejorar este proyecto y por la revisión tan enriquecedora del mismo.

A las Dras. Mónica Lamas Gregori y Marina Macías Silva, por todas las aportaciones tan acertadas que hicieron para mejorar este proyecto.

A Alfredo Ibarra Sánchez por sus invaluable enseñanzas en cada técnica, por su paciencia y por su gran apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A Rodolfo Pérez Lagunes por su valiosa ayuda en el manejo de animales de experimentación y por el excelente apoyo técnico.

A la Dra. Dulce Ávila por sus enseñanzas en la técnica de inmunofluorescencia y por todas las anécdotas compartidas sobre los cultivos de células RBL.

A la Unidad de Microscopía Confocal de los Laboratorios Nacionales de Servicios Experimentales (LaNSE)-Cinvestav y al M. en C. Iván J. Galván por su ayuda en la adquisición de imágenes y por la capacitación brindada en el manejo de los microscopios.

A mis compañeros de laboratorio: Zyan, Itzel, Marian, Pablo, Jorge, Jonatan, Frida y Nancy, por todas las charlas que hicieron más ameno el trabajo del día a día en el laboratorio.

A mis queridos amigos de la maestría: Cris, “Yisus” y Erika, por los grandiosos momentos compartidos y por su apoyo incondicional en cada momento difícil.

A mis amigas de toda la vida: Citlalli, “Karantzin” y María (Karen Hernández), por confiar en mí y ser parte del camino que me trajo hasta aquí.

A mis hermanos Fredy, Edgar, Joanna, Lucio y Juli, por ser mi ejemplo y al mismo tiempo mi mayor motivación para lograr cualquier meta que me propongo.

A Ernesto Griego por su plena confianza en mí y por ser el complemento perfecto de mi vida.

A mis padres, Lucio Segura y Margarita Villalobos, por su amor incondicional y por apoyarme en cada etapa de mi carrera profesional.

A Dios, por el milagro de la vida.

# ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	I
<b>ABREVIATURAS</b> .....	III
<b>RESUMEN</b> .....	VI
<b>ABSTRACT</b> .....	VII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	- 1 -
1.1. Generalidades de las células cebadas .....	- 1 -
1.2. Funciones de las CCs .....	- 2 -
1.3. Plasticidad fenotípica de las CCs.....	- 3 -
1.4. Mecanismos de activación de las CCs .....	- 5 -
1.4.1. El receptor TLR-4 y su sistema de señalización .....	- 6 -
1.4.2. Lipopolisacárido: el ligando natural del receptor TLR-4.....	- 8 -
1.5. Vías de secreción de las CCs .....	- 10 -
1.5.1. Secreción anafiláctica o exocitosis regulada .....	- 11 -
1.5.2. Secreción constitutiva.....	- 11 -
1.5.3. Secreción picemal .....	- 11 -
1.6. Las proteínas SNAREs .....	- 12 -
1.6.1. Formación del complejo SNARE .....	- 13 -
1.6.2. SNAREs y su participación en la secreción de mediadores en CCs .....	- 14 -
1.7. Mediadores inflamatorios liberados por las CCs.....	- 15 -
1.7.1. El Factor de necrosis tumoral (TNF).....	- 16 -
1.8. Modelos experimentales para estudiar la secreción en CCs .....	- 18 -
1.8.1. Modelos <i>in vivo</i> .....	- 18 -
1.8.2. Modelos <i>in vitro</i> .....	- 19 -
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	- 21 -
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	- 24 -
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	- 24 -
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	- 25 -
5.1. Objetivo general.....	- 25 -
5.2. Objetivos particulares .....	- 25 -
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	- 26 -
6.1. Animales .....	- 26 -

6.2.	Reconstitución de los ratones Wsh .....	- 26 -
6.3.	Modelo murino de endotoxemia y lavados peritoneales .....	- 26 -
6.4.	Cultivo de las células RBL-2H3.....	- 27 -
6.5.	Ensayo de secreción de $\beta$ -hexosaminidasa.....	- 27 -
6.6.	Cuantificación de TNF mediante ELISA.....	- 28 -
6.7.	Inmunocitoquímica .....	- 29 -
6.8.	Transfección de siRNAs por el método de lipofección .....	- 30 -
6.9.	Western Blot.....	- 31 -
6.10.	Análisis estadístico .....	- 32 -
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	- 33 -
7.1.	La secreción de TNF en un modelo <i>in vivo</i> de endotoxemia por LPS depende exclusivamente de las CCs .....	- 33 -
7.2.	La administración <i>in vivo</i> del siRNA de VAMP3 no disminuyó la secreción de TNF en el peritoneo .....	- 34 -
7.3.	Las células RBL-2H3 responden a estímulos de la inmunidad adaptativa.....	- 36 -
7.4.	Las células RBL-2H3 responden al LPS después de la sensibilización con IgE e IFN- $\gamma$ .....	- 38 -
7.5.	El TNF colocaliza con VAMP3 y con VAMP8 en células RBL-2H3 estimuladas con LPS.....	- 39 -
7.6.	El empleo de siRNAs disminuye la expresión de VAMP3 y VAMP8.....	- 43 -
7.6.1.	Inhibición de la expresión de VAMP3 .....	- 43 -
7.6.2.	Inhibición de la expresión de VAMP8 .....	- 43 -
7.7.	VAMP8 participa en la secreción de TNF en células cebadas estimuladas con LPS.....	- 45 -
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	- 47 -
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	- 53 -
<b>10.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	- 53 -
<b>11.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	- 54 -
	ANEXO I .....	- 61 -

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Microscopía electrónica de transmisión de una célula cebada en reposo aislada del peritoneo de rata	.....1
<b>Figura 2</b>	Modelo que representa a la célula cebada como un reóstato	.....3
<b>Figura 3</b>	Receptores de reconocimiento de patrones expresados por las células cebadas	.....6
<b>Figura 4</b>	Activación y cascada de señalización canónica del receptor TLR-4	.....8
<b>Figura 5</b>	Estructura química del LPS	.....9
<b>Figura 6</b>	Representación esquemática de los diferentes quimiotipos de LPS aislados de bacterias silvestres o mutantes	.....10
<b>Figura 7</b>	Vías de secreción clásicas en las células cebadas	.....12
<b>Figura 8</b>	Las SNAREs regulan la fusión de los gránulos con la membrana plasmática en células cebadas	.....13
<b>Figura 9</b>	Participación de las diferentes proteínas VAMPs en la liberación de mediadores en células cebadas	.....15
<b>Figura 10</b>	La enzima convertidora de TNF (TACE) escinde al TNF anclado a la membrana	.....17
<b>Figura 11</b>	Aumento en la expresión de CD14 y de MD-2 cuando las células RBL-2H3 son sensibilizadas con IgE más IFN- $\gamma$	.....22
<b>Figura 12</b>	Secreción de TNF en células RBL-2H3 sensibilizadas y estimuladas con diferentes quimiotipos de LPS	.....23



<b>Figura 13</b>	La sensibilización con IgE y con IFN- $\gamma$ aumenta la secreción de TNF en células RBL-2H3 estimuladas con rLPS	.....23
<b>Figura 14</b>	Modelo <i>in vivo</i> de endotoxemia inducido por rLPS	.....34
<b>Figura 15</b>	Participación de VAMP3 en un modelo <i>in vivo</i> de endotoxemia inducido por la administración de rLPS	.....35
<b>Figura 16</b>	Cultivo de células RBL-2H3	.....36
<b>Figura 17</b>	Ensayo de desgranulación en células RBL-2H3	.....37
<b>Figura 18</b>	Cinética de secreción del TNF en las células RBL-2H3	.....38
<b>Figura 19</b>	El uso del TAPI-1 permite visualizar la marca de TNF en el interior de las células RBL-2H3.	.....40
<b>Figura 20</b>	Inmunocitoquímica de las células RBL-2H3	.....41
<b>Figura 21</b>	Cuantificación de la colocalización entre TNF/VAMP3 y TNF/VAMP8	.....42
<b>Figura 22</b>	Inhibición de VAMP3 empleando un siRNA específico	.....44
<b>Figura 23</b>	Inhibición de VAMP8 empleando un siRNA específico	.....44
<b>Figura 24</b>	Participación de VAMP3 y de VAMP8 en el proceso de secreción de TNF	.....46

## ABREVIATURAS

<b>Ag</b>	Antígeno
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>anti-DNP</b>	anti-Dinitrofenol
<b>BMMCs</b>	Células cebadas derivadas de la médula ósea
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CADM-1</b>	Molécula de adhesión celular 1
<b>CCL</b>	Quimiocinas con motivo cisteína-cisteína
<b>CD40L</b>	Ligando de CD40
<b>CTMC</b>	Células cebadas de tejido conectivo
<b>DAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a daño
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNP-HSA</b>	Albúmina sérica humana acoplada a dinitrofenol
<b>dsRNA</b>	RNA de doble cadena
<b>ERK ½</b>	Cinasa regulada por señales extracelulares
<b>FcεRI</b>	Receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina E
<b>GPCR</b>	Receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intercelular tipo 1
<b>IFN-γ</b>	Interferón gamma
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina tipo E
<b>IKK</b>	Cinasa de IκB
<b>IL-1β</b>	Interleucina 1 beta
<b>ILs</b>	Interleucinas

<b>IRAK</b>	Cinasa asociada al receptor de IL-1
<b>ITAMs</b>	Motivos de inmunorreceptores basados en tirosina
<b>IκB</b>	Inhibidor de NFκB
<b>LBP</b>	Proteína de unión al LPS
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LT</b>	Leucotrienos
<b>LTA</b>	Ácido lipoteicoico
<b>MAPKs</b>	Proteína cinasas activadas por mitógenos
<b>MD-2</b>	Proteína de diferenciación mieloide 2
<b>MDSC</b>	Células mieloides supresoras
<b>MHC II</b>	Complejo principal de histocompatibilidad tipo II
<b>MMC</b>	Células cebadas de mucosas
<b>MyD88</b>	Proteína de diferenciación mieloide del gen 88
<b>NFκB</b>	Factor de transcripción nuclear kappa B
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento neural
<b>NLR</b>	Receptores tipo NOD
<b>NSF</b>	Factor sensible a la N-etilmaleimida
<b>OX40L</b>	TNF ligand superfamily member 4
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PG</b>	Prostaglandinas
<b>PGN</b>	Peptidoglicano
<b>PRRs</b>	Receptores de reconocimiento de patrones
<b>r-LPS</b>	LPS rugoso
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>s/r-LPS</b>	LPS liso/rugoso (semi-rugoso)

<b>SCF</b>	Factor de crecimiento células madre
<b>SGs</b>	Gránulos secretores
<b>siRNA</b>	RNA pequeño de interferencia
<b>s-LPS</b>	LPS liso
<b>SNAP-23</b>	Proteína de 23 kDa asociada al sinaptosoma
<b>SNAREs</b>	Receptores de proteínas de unión solubles al NSF
<b>ssRNA</b>	RNA de cadena sencilla
<b>STX-4</b>	Sintaxina 4
<b>TABs</b>	Proteínas de unión a TAK
<b>TACE</b>	Enzima convertidora de TNF
<b>TAK</b>	Cinasa activada por el TGF $\beta$
<b>TAPI</b>	Inhibidor de la TACE
<b>TGF<math>\beta</math>1</b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>TIR</b>	Dominio relacionado al receptor de IL-1
<b>TIRAP</b>	Proteína adaptadora que contiene el dominio TIR
<b>TLR-4</b>	Receptor tipo-Toll 4
<b>TLRs</b>	Receptores tipo-Toll
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TRAF-6</b>	Factor 6 asociado al receptor de TNF
<b>UBC13</b>	Enzima 13 de conjugación de ubiquitina
<b>UEV1A</b>	Enzima E2 de conjugación de ubiquitina variante 1
<b>VAMPs</b>	Proteínas de membrana asociadas a vesículas
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular

## RESUMEN

Las células cebadas (CCs) son células secretoras del sistema inmune que tienen la capacidad de liberar una amplia variedad de mediadores inflamatorios en respuesta a estímulos de la inmunidad innata y adaptativa, siguiendo vías de secreción diferentes. La activación de las CCs a través del receptor TLR-4, lleva a la liberación de citocinas proinflamatorias como el TNF, el cual tiene un papel fundamental en la respuesta inmune. Sin embargo, su secreción excesiva representa un problema central en diversas enfermedades inflamatorias. Los mecanismos que regulan la secreción de esta citocina implican la participación de diferentes proteínas, dentro de las cuales se encuentran las SNAREs, que catalizan los procesos de fusión de las membranas y conducen a la liberación de mediadores inflamatorios almacenados en las vesículas o gránulos de las células.

En este trabajo estudiamos el papel de dos SNAREs, VAMP3 y VAMP8, en la secreción de TNF estimulada por LPS en la línea celular RBL-2H3, ampliamente utilizada como modelo de CCs. Encontramos que ambas proteínas se asocian con vesículas que contienen TNF, pero su participación en la secreción de esta citocina es diferencial. La inhibición de VAMP3 con un siRNA específico, no provocó cambios en el perfil de secreción de TNF después de un reto con el LPS. Sorprendentemente, el *knockdown* de VAMP8 disminuyó drásticamente la secreción de TNF tras el reto con LPS. Más aún, tras el reto con LPS, observamos un incremento en el porcentaje de colocalización entre TNF y VAMP8 que no fue observado entre TNF y VAMP3. Esto sugiere que la proteína VAMP8 controla la secreción de TNF estimulada por LPS en CC.

Nuestros resultados contribuyen al mejor entendimiento del tráfico vesicular y a los mecanismos moleculares que subyacen a la liberación de TNF en las CCs. El estudio de estos mecanismos permitirá diseñar nuevas estrategias terapéuticas para la inhibición selectiva de mediadores inflamatorios liberados por este tipo celular.

## **ABSTRACT**

Mast cells (MC) are immune system secretory cells that have the ability to release a whole variety of inflammatory mediators in response to stimuli of innate and adaptive immunity, following different secretion pathways. MC stimulation through Toll-like receptor 4 (TLR-4) induces release of inflammatory cytokines such as TNF, which is fundamental to the immune response. However, its excessive secretion represents a significant clinical problem in many inflammatory diseases. The mechanisms that regulate the secretion of this cytokine involve the participation of different proteins, amongst them SNAREs, which catalyze the fusion processes of the membranes and lead to the release of inflammatory mediators stored in the vesicles or granules of the cells.

Here, we study the role of two SNAREs (VAMP3 and VAMP8) in the LPS-stimulated TNF secretion in the cell line RBL-2H3, widely used as a mast cell (MC) model. We demonstrate that TNF-containing granules were VAMP8 and VAMP3 positive, but their participation in the secretion of this cytokine was differential. VAMP3 inhibition with a specific siRNA did not show changes in the TNF secretion profile after a LPS-challenge. Surprisingly, VAMP8-knockdown markedly reduced TNF secretion after LPS-challenge. Furthermore, upon stimulation with LPS, we observed an increase in the colocalization percentage between TNF and VAMP8, but that was not observed between TNF and VAMP3. These results suggesting that VAMP8 protein controls the TNF secretion in MC stimulated by LPS.

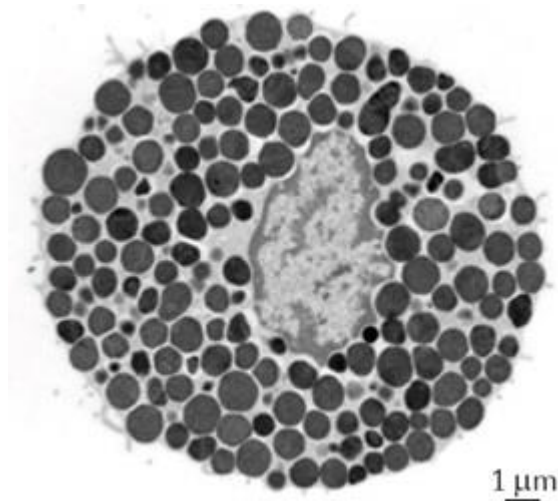
Our results contribute to knowledge about vesicular trafficking and the molecular mechanisms that underlie the TNF-release in MC. The study of these mechanisms could be helpful for design new therapeutic strategies for selective inhibition of inflammatory mediators released by MC.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Generalidades de las células cebadas

Las células cebadas (CCs) son células del sistema inmune especializadas en procesos de secreción que han sido identificadas en toda clase de vertebrados y que se encuentran en casi todos los tejidos del organismo, principalmente en sitios que están expuestos a componentes del ambiente externo, como la piel, las vías respiratorias y el lumen intestinal, de tal manera que funcionan como centinelas en la defensa del huésped (Ribatti & Crivellato, 2011; Marshall, 2004).

Su principal característica morfológica es la presencia de gránulos secretores (SGs) electrodensos similares a los lisosomas de otras células, por lo cual también se les conoce como lisosomas secretores. Éstos ocupan la mayor parte del citoplasma de la célula madura (figura 1) y contienen diversos mediadores inflamatorios preformados que pueden ser liberados al medio extracelular tras la activación de las CCs (Blank et al., 2014; Wernersson & Pejler, 2014).



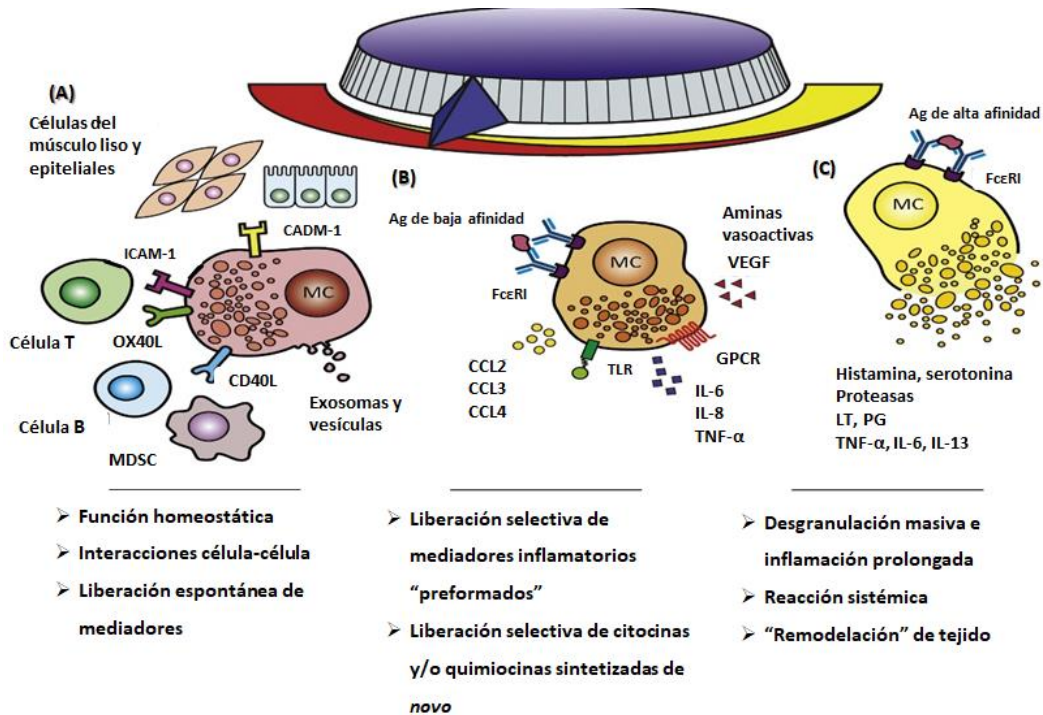
**Figura 1.** Microscopía electrónica de transmisión de una célula cebada en reposo aislada del peritoneo de rata donde se observan los gránulos electrodensos ocupando prácticamente todo el citoplasma de la célula. Imagen tomada de Lundequist & Pejler, 2011.

## 1.2. Funciones de las CCs

Las CCs tienen la capacidad de producir, almacenar y liberar una amplia variedad de mediadores inflamatorios que participan tanto en procesos fisiológicos como patológicos (Frossi et al., 2018). Se conoce con detalles su participación en las reacciones alérgicas, en el reconocimiento de diferentes patógenos y en la modulación de las respuestas de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa (St John & Abraham, 2013). Además, tienen un papel relevante en la cicatrización de heridas y en el mantenimiento de la homeostasis tisular, así como en la inflamación crónica que se presenta en enfermedades autoinmunes, la aterosclerosis y el cáncer (Murray, 2013; Frossi et al., 2017).

Esta dualidad en las funciones de las CCs permite considerarlas como un reóstato, capaz de modular la intensidad de sus respuestas de acuerdo a las señales que recibe del microambiente tisular (figura 2). En ausencia de estimulación, las CCs tienen funciones homeostáticas interactuando con otras células del sistema inmune y liberando mediadores de manera espontánea; sin embargo, cuando reciben señales endógenas o exógenas de baja afinidad, son capaces de responder con una liberación selectiva de mediadores inflamatorios preformados o sintetizados *de novo* que desencadenan una respuesta local. Por último, si las CCs son estimuladas intensamente con señales exógenas o endógenas de alta afinidad, responderán con una liberación masiva de mediadores que dará como resultado una inflamación crónica y una reacción tanto local como sistémica (Frossi et al., 2017).





**Figura 2.** Modelo que representa a la célula cebada como un reóstato capaz de modular la intensidad de la respuesta inmune dependiendo del estímulo presente en el microambiente tisular. Imagen tomada de Frossi et al., 2017.

### 1.3. Plasticidad fenotípica de las CCs

Las CCs se originan en la médula ósea a partir de un precursor común mieloide, aunque recientes estudios demuestran que también pueden originarse en el saco vitelino (Gentek et al., 2018). Los precursores de las CCs viajan por la circulación sanguínea y migran rápidamente a los tejidos para completar su diferenciación final, bajo la influencia de señales que no se conocen del todo. Se sabe que las CCs expresan una gran variedad de receptores de membrana para muchos ligandos con propiedades quimioatrayentes, incluyendo al receptor c-Kit que reconoce al factor de células madre (SCF), el cual es el principal factor de crecimiento de este tipo celular. Otros factores que también ayudan al crecimiento y diferenciación de las CCs son: el NGF (factor de crecimiento neural), el TGFβ1 (factor de crecimiento transformante beta), varias interleucinas (ILs) como la IL-3, IL-4 y

la IL-9 y quimiocinas como CCL11, CCL24 y CCL26 (Beghdadi et al., 2011; Murray, 2013; Frossi et al., 2017).

Adicionalmente, las CCs se pueden diferenciar en subpoblaciones y clasificarse dependiendo del tejido donde se localicen y de su contenido granular. En humanos existen al menos 2 tipos: las positivas a triptasa (MC<sub>T</sub>) que se localizan principalmente en mucosas; y las positivas a triptasa y quimasa (MC<sub>TC</sub>), localizadas preferentemente en la piel. Por otra parte, en roedores se clasifican en células cebadas de tejido conectivo (CTMC), cuyos gránulos contienen abundante heparina; y en células cebadas de mucosas (MMC), con poca o nula cantidad de heparina (Saito et al., 2006; Frossi et al., 2017). La heterogeneidad de las CCs está sustentada por diversos estudios que han demostrado que son el tipo celular que posee más variaciones a nivel transcripcional, comparadas con otras células del sistema inmune; y que, incluso las CCs aisladas de diferentes tejidos muestran un perfil de expresión genética muy variado (Saito et al., 2006; Dwyer et al., 2016). Esto nos habla de la gran plasticidad fenotípica que poseen las CCs y de su capacidad para adquirir características específicas dependiendo del ambiente en donde se desarrollen. Dichas características van desde diferencias en el contenido de sus gránulos y en los patrones de expresión de citocinas y receptores (Frossi et al., 2018) hasta la susceptibilidad a ser activadas por diferentes estímulos, su capacidad para producir diferentes mediadores inflamatorios y la magnitud de sus respuestas de secreción (Beghdadi et al., 2011).

De manera particular, la actividad secretora de las CCs es controlada por una amplia variedad de citocinas que ejercen efectos directos tanto estimuladores como reguladores (Eastmond et al., 1997), entre ellas se encuentra el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), que regula la liberación de mediadores, el crecimiento celular, la citotoxicidad mediada por el factor de necrosis tumoral (TNF) y la expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) tipo II en CCs peritoneales de roedores (Eastmond et al., 1997), mientras que en las CCs de humanos aumenta los niveles de expresión del receptor tipo Toll 4

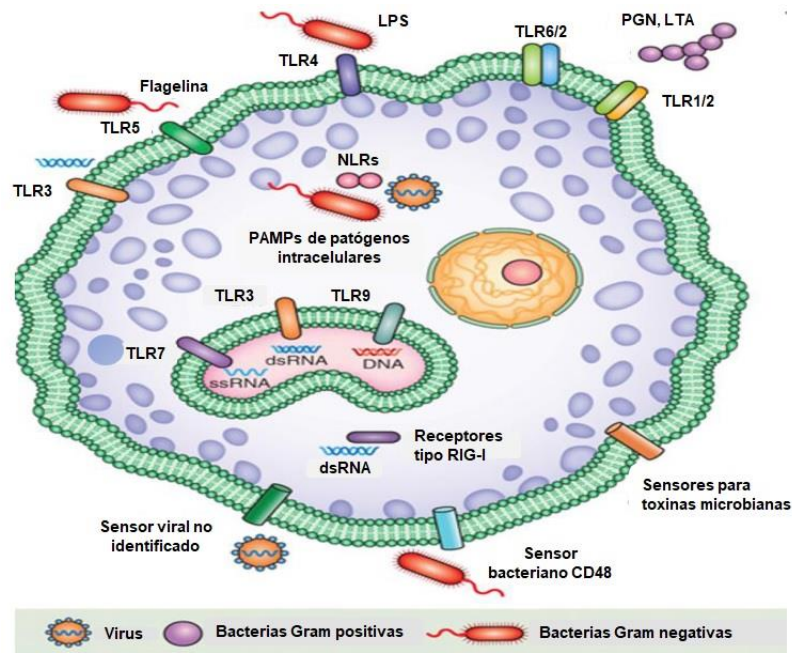
(TLR-4) (Okumura et al., 2003). Por lo anterior, se considera que el IFN- $\gamma$  es importante para cambiar el fenotipo de estas células.

#### **1.4. Mecanismos de activación de las CCs**

Las CCs son activadas por una gran variedad de estímulos debido a que expresan muchos receptores, tanto en la superficie de su membrana plasmática como de forma intracelular.

La forma de activación más conocida es la dependiente del receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina E (Fc $\epsilon$ RI). Este receptor consta de una cadena  $\alpha$ , una cadena  $\beta$  y dos cadenas  $\gamma$ . La cadena  $\alpha$  es el sitio de unión de la inmunoglobulina E (IgE), mientras que las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  son las encargadas de la señalización intracelular mediante dominios ricos en tirosinas conocidos como ITAMs. Cuando un alérgeno o antígeno multivalente se une a la región variable de las IgEs, que a su vez están unidas al Fc $\epsilon$ RI, induce el entrecruzamiento de dos o más receptores conduciendo a la activación de las CCs y, en consecuencia, la liberación de los mediadores preformados y almacenados en los SGs mediante un proceso conocido como desgranulación anafiláctica. Esta activación también induce la síntesis *de novo* de mediadores lipídicos derivados del ácido araquidónico y de diversos factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas (Galli et al., 2005).

Por otra parte, las CCs también responden a estímulos de la inmunidad innata debido a que expresan una amplia variedad de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (figura 3), como los receptores tipo Toll (TLRs), los receptores intracelulares tipo NOD (NLRs) y las helicasas RIG-I (Murray, 2013; St John & Abraham, 2013). Estos receptores reconocen a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y a daño (DAMPs), y le confieren a las CCs la capacidad de responder ante una gran variedad de microorganismos o moléculas producidas por el daño tisular.



**Figura 3.** Receptores de reconocimiento de patrones expresados en las células cebadas que les permite reconocer una gran variedad de PAMPs y DAMPs. Como se puede observar, estas células expresan diversos TLRs que se localizan tanto en la superficie de la membrana plasmática (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6) como en endosomas (TLR-3, TLR-7 y TLR-9). Imagen tomada de St John & Abraham, 2013.

De los TLRs, el receptor TLR-4 es el más estudiado en las CCs y sus mecanismos de activación y señalización se han comenzado a caracterizar en este tipo celular. Particularmente se sabe que la activación del TLR-4 no provoca desgranulación, pero sí induce la liberación de citocinas proinflamatorias por mecanismos que no han sido completamente elucidados (Sandig & Bulfone-Paus, 2012).

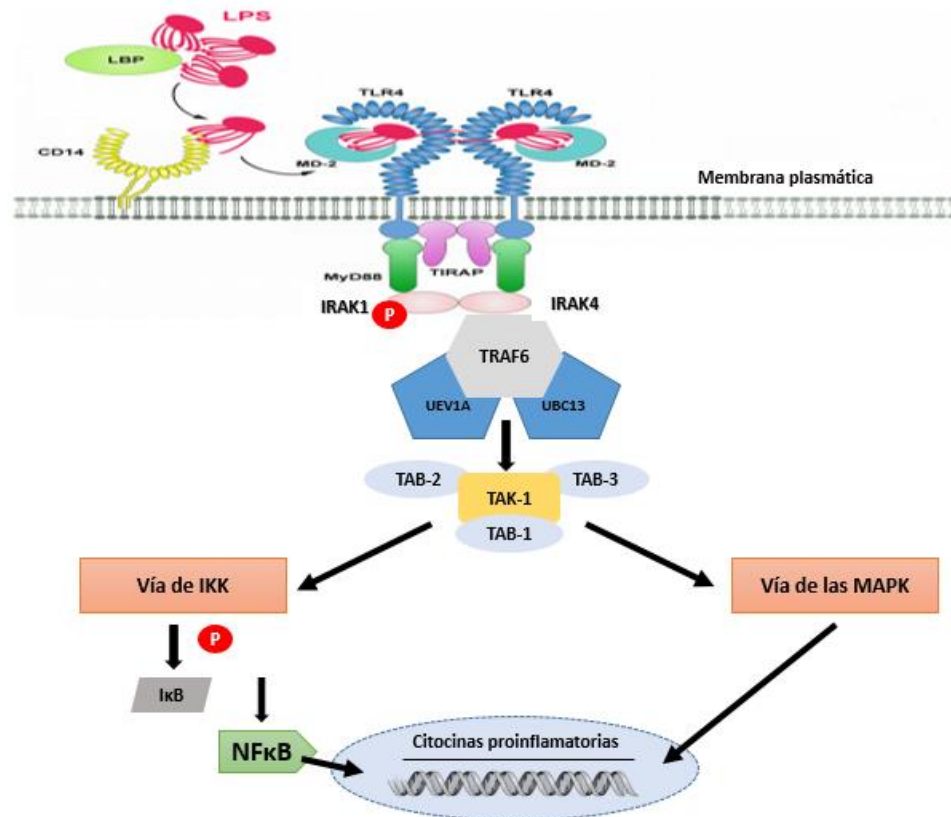
#### 1.4.1. El receptor TLR-4 y su sistema de señalización

El TLR-4 es un receptor que atraviesa una sola vez la membrana plasmática, contiene dominios ricos en leucina en su porción extracelular y una región intracelular que tiene un dominio de gran homología con el receptor para la IL-1 (TIR). Este dominio es necesario para la señalización del receptor,

además de que también está presente en las proteínas adaptadoras del TLR-4 (Xu et al., 2000; Płóciennikowska et al., 2015).

La activación del receptor TLR-4 requiere de una serie de eventos que empiezan con la unión del LPS soluble a la LBP para ser transportado hasta la célula, donde es reconocido por un co-receptor llamado CD14; éste, a su vez, lo transfiere hacia el complejo formado por la proteína de diferenciación mieloide 2 (MD-2) y el TLR-4 (Płóciennikowska et al., 2015). La formación de un dímero compuesto por TLR4-MD2-LPS, inicia el reclutamiento de adaptadores como TIRAP/MyD88. MyD88 es una proteína importante que recluta (a través de uniones homotípicas) a las cinasas conocidas como IRAKs. Posteriormente, IRAK4 fosforila a IRAK1 con lo cual se forma un complejo integrado por una ligasa de ubiquitina conocida como TRAF-6 y dos enzimas de conjugación de ubiquitina llamadas UEV1A y UBC13. Este complejo a su vez activa un complejo preformado compuesto por TAK1 y TAB. En este paso, la señal se bifurca para activar, por un lado, la vía de las MAPKs y, por otro, la vía de la cinasa del inhibidor del factor I $\kappa$ B (IKK). IKK tiene un papel fundamental en la activación de NF $\kappa$ B ya que fosforila a I $\kappa$ B para que pueda ser degradado por el proteasoma. Con esto, NF $\kappa$ B queda libre y puede translocarse al núcleo para regular la expresión de diversos genes involucrados en la proliferación celular, la supervivencia y la síntesis de citocinas como TNF, IL-6, IL-1 $\beta$  y otras citocinas proinflamatorias importantes (Avila & Gonzalez-Espinosa, 2011).

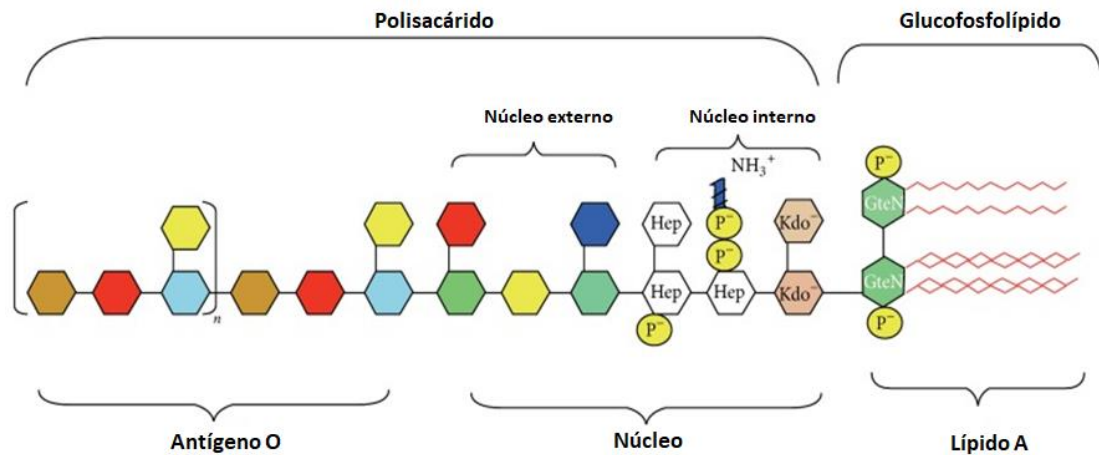
Esta vía se conoce como vía dependiente de MyD88 (Figura 4). La señalización del TLR-4 en las CCs parece ser dependiente de esta vía ya que los elementos para la vía independiente de MyD88 no se han detectado del todo en este tipo celular (Keck et al., 2011).



**Figura 4.** Activación y cascada de señalización canónica del receptor TLR-4, dependiente de MyD88, que lleva a la síntesis de citocinas proinflamatorias como TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$ , mediante la activación de IKK y de las MAPKs. Imagen modificada de Płóciennikowska et al., 2015.

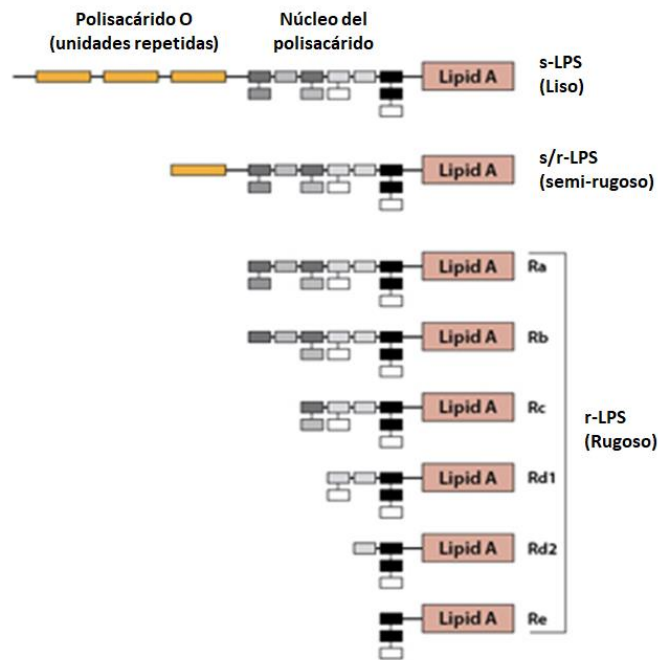
#### 1.4.2. Lipopolisacárido: el ligando natural del receptor TLR-4

El TLR-4 juega un papel importante en la defensa contra bacterias Gram negativas ya que reconoce con gran especificidad al lipopolisacárido (LPS) bacteriano o endotoxina, que forma parte de la membrana externa de esta clase de bacterias. Estructuralmente, el LPS consta de una porción lipídica (anclada a la membrana de la bacteria), un núcleo de oligosacáridos y una región altamente variable denominada antígeno O, compuesta de unidades repetidas de oligosacáridos (Figura 5). La porción lipídica, denominada lípido A, es la parte más conservada evolutivamente y la responsable de la actividad endotóxica del LPS (Płóciennikowska et al., 2015; Sun & Shang, 2015).



**Figura 5.** Estructura química del LPS. El lípido A consta de un disacárido de glucosamina (GlcN) fosforilado (P). El núcleo interno incluye azúcares característicos del LPS como el ácido 3-desoxi D-manoctulosónico (Kdo) y el L-glicero-D-manoheptosa (Hep). Imagen tomada de Sun & Shang, 2015.

Existen diferentes quimiotipos de LPS dependiendo la bacteria de la que se aísla. La mayoría de las bacterias Gram negativas silvestres sintetizan la forma “s”, la cual consta de las tres regiones anteriormente descritas. Sin embargo, las mutantes de bacterias Gram negativas (llamados mutantes rugosos) sintetizan una forma “r” de LPS que carece de la cadena O del polisacárido y presenta variaciones en la longitud del núcleo de oligosacáridos, dependiendo de la clase a la que pertenece el mutante (Figura 6). Estas dos formas de LPS también presentan diferencias en la forma de activar al receptor TLR-4; se ha demostrado que la forma “s” requiere la participación de CD14, mientras que la forma “r” puede activar a la célula en presencia o en ausencia de esta molécula (Huber et al., 2006).



**Figura 6.** Representación esquemática de los diferentes quimiotipos de LPS aislados de bacterias silvestres o mutantes. Se observa que la principal diferencia es en la longitud de la cadena de polisacáridos del LPS. Imagen modificada de Huber et al., 2006.

## 1.5. Vías de secreción de las CCs

La secreción es un proceso celular fundamental que involucra la liberación regulada de productos intracelulares al exterior de la propia célula. Los productos de secreción son almacenados en sacos o vesículas membranosas y pueden ser liberados gracias al acoplamiento y fusión de estas vesículas con estructuras supramoleculares asociadas a la membrana plasmática, las cuales reciben el nombre de porosoma (Jena, 2007). Funciones fisiológicas indispensables tales como la neurotransmisión o la liberación de hormonas y enzimas digestivas, están regidas por procesos de secreción celular altamente regulados (Jena, 2007; Nickel & Rabouille, 2009). En el caso de las células del sistema inmune, incluidas las CCs, la liberación de mediadores inflamatorios es fundamental para la comunicación entre células y para la regulación de la respuesta inmune.



Las etapas tempranas de las vías de secreción son comunes en todas las células eucariotas. Los precursores de las proteínas son plegados e inicialmente glucosilados en el retículo endoplásmico (ER), y ahí mismo se cargan en vesículas acarreadoras para ser transportadas al complejo de Golgi, en donde el procesamiento post-traducciona continúa. Las proteínas llegan finalmente a la red trans-Golgi (TGN) en donde las vías de secreción divergen y difieren en rutas y transportadores (Stow et al., 2009).

Las vías de secreción más importantes en las CCs son: la secreción anafiláctica, la secreción constitutiva y la secreción picemal (Figura 7).

#### **1.5.1. Secreción anafiláctica o exocitosis regulada**

Es la vía de secreción más estudiada en las CCs ya que ocurre de forma masiva y en pocos minutos después de la activación del FcεRI por el complejo IgE/Antígeno. En este tipo de secreción, las membranas de los SGs se fusionan entre sí de forma multivesicular o secuencial, para que finalmente se fusionen con la membrana plasmática de la célula, liberando el contenido granular en un solo evento que es dependiente del aumento masivo de calcio intracelular (Lorentz et al., 2012).

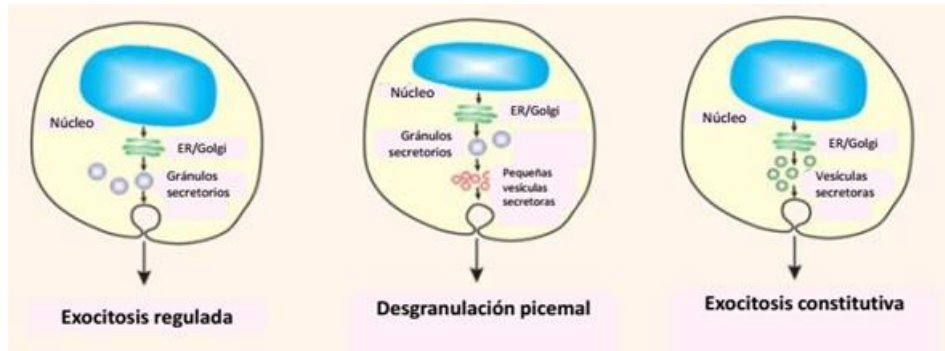
#### **1.5.2. Secreción constitutiva**

En este tipo de secreción, los mediadores sintetizados *de novo* son almacenados en pequeñas vesículas independientes de los SGs, y son transportados desde la TGN hasta la membrana plasmática con la que se fusionan directamente. La secreción constitutiva es el mecanismo predominante para la liberación de citocinas, que ocurre horas después del estímulo externo inicial y es independiente del aumento masivo de calcio intracelular (Lacy & Stow, 2011).

#### **1.5.3. Secreción picemal**

La secreción picemal consiste en la liberación progresiva de mediadores preformados almacenados en los SGs, donde no se observan eventos obvios de fusión gránulo-gránulo o gránulo-membrana plasmática. En este tipo de

secreción, pequeñas vesículas se desprenden de los gránulos y la liberación de mediadores ocurre de forma lenta e independiente del aumento masivo de calcio intracelular (Lorentz et al., 2012; Ribatti & Crivellato, 2011).



**Figura 7.** Vías de secreción clásicas en las células cebadas que permiten la liberación de mediadores inflamatorios por diferentes mecanismos, que culminan con la fusión de la membrana lipídica del gránulo o vesícula con la membrana de la célula. Imagen tomada de Lacy & Stow, 2011.

## 1.6. Las proteínas SNAREs

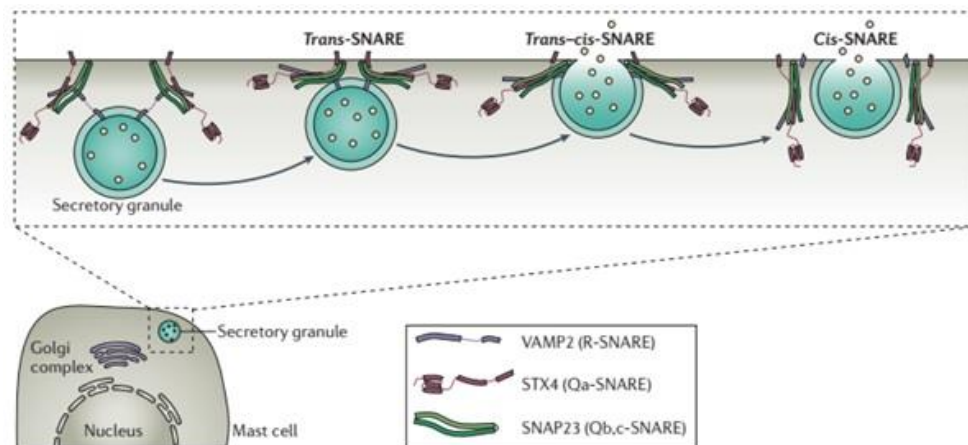
La mayoría de los procesos de secreción celular involucran a un grupo de proteínas especiales conocidas como SNAREs (acrónimo del inglés *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) que están conservadas evolutivamente en todas las células eucariontes y cuya función principal es regular el transporte vesicular y los eventos de fusión de membranas durante la exocitosis (Wernersson & Pejler, 2014).

Funcionalmente, las SNAREs se clasifican en v-SNAREs, las cuales incluyen a las proteínas de membranas asociadas a vesículas (VAMPs), y en t-SNAREs (presentes en el membrana plasmática de la célula blanco) que incluyen principalmente a las sintaxinas (STX) y a las proteínas asociadas al sinaptosoma (SNAPs) (Tiwari et al., 2008). Sin embargo, se han encontrado algunas SNAREs, como SNAP-23, que pueden estar tanto en las vesículas como en la membrana plasmática (Naskar & Puri, 2017); por lo que existe otra clasificación que se basa en un residuo de aminoácidos altamente conservado

en el motivo SNARE de estas proteínas. Si el aminoácido es arginina, se clasifican como R-SNAREs (usualmente están presentes en las vesículas); mientras que si el aminoácido es glutamina, se les conoce como Q-SNAREs y están presentes en la membrana plasmática de la célula blanco (Stow et al., 2006).

### 1.6.1. Formación del complejo SNARE

Para que se lleve a cabo la fusión de las dos membranas se necesita la participación de al menos una v-SNARE y dos t-SNAREs, las cuales forman un complejo tetramérico estabilizado por interacciones iónicas entre los dominios SNAREs de cada proteína y por uniones hidrofóbicas entre los aminoácidos arginina y glutamina conservados en dicho dominio (Hong, 2005; Zhang et al., 2016). Este complejo tetramérico altamente estable es conocido como complejo trans-SNARE y lleva a la fusión de las membranas opuestas y a la secreción del contenido granular. El complejo SNARE, después de la fusión de las membranas y antes de desensamblarse, se conoce como complejo cis-SNARE (Figura 8) (Stow et. al., 2006; Lorentz et.al., 2012).



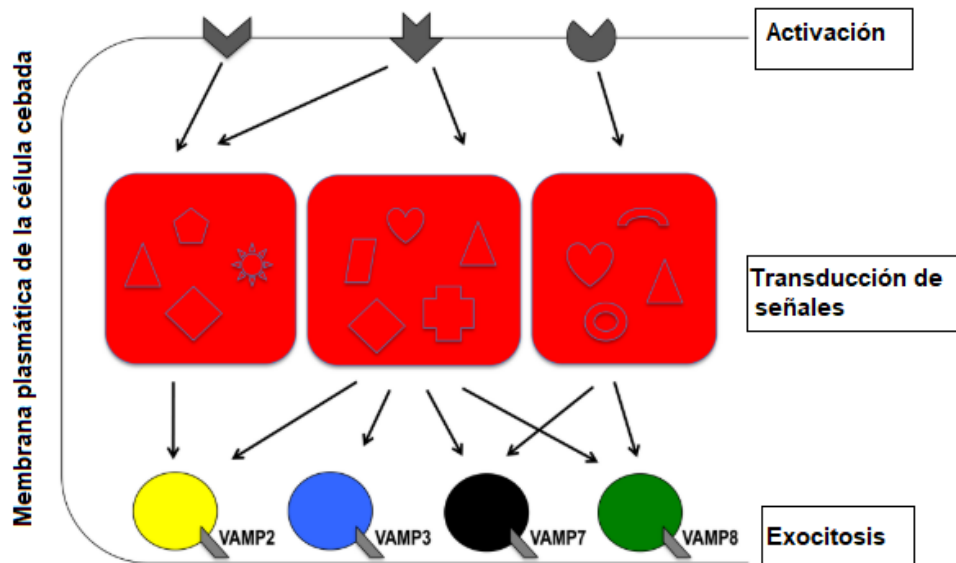
**Figura 8.** Las SNAREs regulan la fusión de los gránulos con la membrana plasmática en células cebadas. La proteína SNAP-23 contiene 2 motivos SNARE que junto con los motivos de VAMP2 y STX-4 forman el complejo tetramérico altamente estable que permite que las dos membranas lipídicas rompan la fuerza de repulsión y puedan fusionarse. Imagen tomada de Stow et al., 2006.

### **1.6.2. SNAREs y su participación en la secreción de mediadores en CCs**

Las CCs expresan al menos siete proteínas SNAREs, que son: STX-3, STX-4, SNAP-23, VAMP2, 3, 7 y 8 (Xu et al., 2018) . Sin embargo, la participación diferencial de estas proteínas en los mecanismos de secreción ha sido parcialmente explorada. Se cree que, independientemente del mecanismo de activación y la vía de secreción, las CCs podrían utilizar cada proteína VAMP para la liberación de un grupo de mediadores específicos (figura 9) (Xu et al., 2018).

Previos estudios han demostrado que las CCs usan a SNAP-23 y a STX-4 para la desgranulación dependiente de IgE (Vaidyanathan et al., 2001). Además, hay reportes que demuestran que VAMP8 controla la liberación de serotonina, catepsina y  $\beta$ -hexosaminidasa en la secreción anafiláctica (Puri & Roche, 2008) mientras que VAMP3 se ha relacionado con la secreción constitutiva de citocinas después de la estimulación con ligandos como IL-1 $\beta$  (Tiwari et al., 2008; Tiwari et al., 2009; Moon et al., 2014).

A pesar de estos estudios, la participación específica de las VAMPs no se conoce del todo en las CCs; por lo que, el estudio de estos mecanismos permitirá diseñar nuevas estrategias terapéuticas para la inhibición selectiva de mediadores en este tipo celular.



**Figura 9.** Participación de las diferentes proteínas VAMPs en la liberación de mediadores inflamatorios. Las células cebadas pueden ser activadas a través de diferentes receptores pero todos convergen en la fusión de membranas y la consecuente liberación de los mediadores contenidos en las vesículas o gránulos. En este modelo se propone que cada proteína VAMP sea la responsable de la liberación de un grupo de mediadores específicos en las células cebadas. Imagen tomada de Xu et al., 2018.

## 1.7. Mediadores inflamatorios liberados por las CCs

La activación de las CCs, por estímulos tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa, tiene como respuesta final la síntesis y/o liberación de mediadores inflamatorios, los cuales pueden ser divididos en mediadores preformados y mediadores sintetizados *de novo*. Dentro de los mediadores preformados (almacenados en los SGs) se encuentran aminas biogénicas como histamina y serotonina; diversas proteasas como triptasas, quimasas, catepsinas y carboxipeptidasas; enzimas como la  $\beta$ -hexosaminidasa y algunas citocinas como TNF. Mientras que los mediadores sintetizados *de novo* pueden ser derivados del ácido araquidónico como las prostaglandinas y leucotrienos, los cuales no involucran la activación de la transcripción de genes; o bien, los que requieren la activación de factores que se translocan al núcleo e inducen la transcripción de genes. Dentro de éstos últimos se

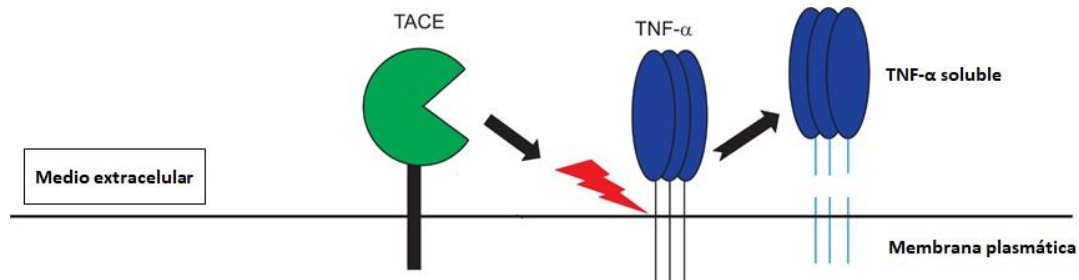
encuentran citocinas como TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6; quimiocinas como CCL-2; factores de crecimiento como el VEGF, entre otros.

Las CCs tienen la capacidad de liberar su matriz completa de mediadores o únicamente algunos de ellos, bajo condiciones particulares de estimulación. Se sabe que la estimulación a través del receptor Fc $\epsilon$ RI generalmente conduce a una respuesta completa y liberación masiva de mediadores almacenados en gránulos y sintetizados *de novo*, mientras que la estimulación a través de receptores TLRs o a través de algunos receptores de citocinas induce la liberación selectiva de quimiocinas y citocinas recién sintetizadas en ausencia de desgranulación (Blank et al., 2014). Una de las citocinas más importantes que secretan las CCs en respuesta a la activación del receptor TLR-4, es el TNF, el cual es de especial interés en este trabajo.

#### **1.7.1. El Factor de necrosis tumoral (TNF)**

El TNF es una potente citocina proinflamatoria secretada por muchas células del sistema inmune innato, principalmente por macrófagos activados, pero también puede ser secretado por neutrófilos, CCs, eosinófilos, células dendríticas y células NK (Lacy & Stow, 2011). La liberación de TNF conlleva a la activación y reclutamiento de otras células al sitio de la infección, siendo fundamental para la respuesta inmune. Sin embargo, la secreción excesiva de esta citocina sigue siendo un problema clínico relevante en enfermedades que cursan con un proceso inflamatorio agudo o crónico (Stow et al., 2009).

En macrófagos activados por LPS, se sabe que el TNF sintetizado *de novo* se acumula transitoriamente en el aparato de Golgi y que, posteriormente viaja a la membrana plasmática donde es escindido por la TACE o ADAM17, una metaloproteasa que lo convierte en una citocina soluble (figura 10) para que pueda unirse a sus receptores (TNF-R1 o TNF-R2) y ejercer sus efectos pleiotrópicos, como son: apoptosis, proliferación celular y producción de otras citocinas (Stow et al., 2009; Horiuchi et al., 2010).



**Figura 10.** La enzima convertidora de TNF (TACE) escinde al TNF anclado a la membrana permitiendo que pueda ser liberado al medio extracelular como una citocina soluble para ejercer sus diferentes efectos. Imagen modificada de Lee et al., 2016.

La secreción de TNF en respuesta al LPS, se ha comenzado a caracterizar en las CCs. Se sabe que estas células son capaces de almacenar el TNF en sus gránulos, pero también pueden sintetizarlo *de novo* una vez que llega el estímulo (Wernersson & Pejler, 2014), por lo tanto, puede ser secretado por las tres diferentes vías de secreción: anafiláctica, constitutiva y picemal; pero no se conoce el tráfico vesicular detallado ni todas las proteínas involucradas en la liberación de TNF tras la activación de las CCs con LPS. Diversos estudios realizados en nuestro laboratorio han contribuido al mejor entendimiento de esta vía. En el 2013, Madera-Salcedo y colaboradores demostraron que la cinasa IKK fosforila a SNAP-23, una tSNARE necesaria para la fusión del gránulo o vesícula con la membrana plasmática de la célula, y que esto lleva a la secreción de TNF en BMMCs sensibilizadas con IgE y retadas con LPS. También se sabe del papel regulador positivo o negativo que juegan las cinasas Lyn y Fyn, respectivamente, en la señalización del receptor TLR-4 en el mismo modelo celular (Ávila et al., 2011; Martín-Ávila et al., 2016). Por último, Guzmán-Mejía y colaboradores en el 2018, demostraron que ERK 1/2 fosforila a la TACE y que esto conduce la secreción de TNF tras la activación del TLR-4 en BMMCs.

También se sabe que, el TNF secretado en respuesta al LPS mediante la activación del TLR-4, tiene un papel protector *in vivo* y su secreción depende exclusivamente de las CCs a tiempos cortos de estimulación. Esto se confirmó en ratones carentes de CCs, los cuales fueron incapaces de sintetizar TNF poco después de la inyección intraperitoneal de bacterias Gram negativas y murieron rápidamente después de la infección. Sin embargo, cuando se reconstituyeron con CCs derivadas de médula ósea (BMMCs) obtenidas de animales *wild type* se reestableció la producción de TNF intraperitoneal y los ratones sobrevivieron (Malaviya et. al., 1996; Echtenacher et. al., 1996).

## **1.8. Modelos experimentales para estudiar la secreción en CCs**

La vía de señalización del TLR-4 así como todos los eventos y elementos involucrados en la secreción de citocinas proinflamatorias, como el TNF, puede ser estudiada en CCs utilizando diversos modelos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro*.

### **1.8.1. Modelos *in vivo***

Los ratones carentes de CCs son animales genéticamente modificados que se utilizan para estudiar la participación exclusiva de las CCs en procesos fisiológicos y patológicos. Dentro de éstos, se encuentran los ratones *Kit<sup>Wsh/Wsh</sup>* (comúnmente conocidos como “Wsh”) los cuales presentan una mutación por inversión en la región *upstream* del elemento regulador de la transcripción del gen c-Kit. La mutación provoca una marcada disminución en la actividad de cinasa de tirosinas del receptor c-Kit, lo que resulta en una alteración en el desarrollo, la supervivencia y la función de las CCs, pero sin afectar el desarrollo de otras células de origen hematopoyético; por lo que estos ratones son fértiles y no presentan anemia. También presentan la ventaja de que pueden ser reconstituidos exitosamente con BMMCs por diferentes vías de administración (Grimbaldeston et al., 2005).



Por lo tanto, los ratones Wsh son un buen modelo para evaluar el papel de las CCs en diversos procesos y su participación específica en la liberación de mediadores inflamatorios cuando los ratones se retan con diferentes estímulos. Gracias al uso de los ratones reconstituidos, se ha demostrado que las CCs son las primeras células que secretan TNF en la cavidad peritoneal en respuesta a la sepsis provocada por bacterias Gram-negativas (Malaviya et al., 1996; Echtenacher et al., 1996). Además, diversos estudios en nuestro laboratorio, ha evaluado la participación de las CCs en la secreción de TNF tras la administración intraperitoneal (i.p.) de LPS (Madera-Salcedo et al., 2013; Martín-Ávila et al., 2016; Guzmán-Mejía et al., 2018).

### **1.8.2. Modelos *in vitro***

Dentro de los modelos *in vitro* se han utilizado cultivos celulares primarios así como líneas celulares inmortalizadas. De éstas últimas destacan las células RBL-2H3 que fueron generadas en ratas a las cuales se les inyectó un agente químico carcinógeno (el  $\beta$ -cloroetilamina) y desarrollaron una leucemia que tenía como característica principal la alta concentración de basófilos en sangre (de ahí sus siglas RBL por *Rat Basophilic Leukemia*). Los tumores generados en estas ratas fueron inyectados en otras ratas y subsecuentemente se adaptaron a cultivos (Eccleston et al., 1973; Kulczycki et al., 1974). Se encontró que estas células unían específicamente a la IgE pero que no respondían a la estimulación con antígeno o con un ionóforo de calcio. Después de varias clonas se aislaron células capaces de desgranular en respuesta a la estimulación con Ag, dando lugar a la línea RBL-2H3. Estas células comparten características con los basófilos y las CCs, sin embargo se han utilizado ampliamente como modelo de CCs, lo cual está sustentado por la expresión de receptores como c-Kit, que es un marcador de CCs. Pero las RBL-2H3 no expresan el receptor para IL-3 (CD123), el cual es un marcador de basófilos. Dada la diferencia en la expresión de estos marcadores, se considera que la línea RBL-2H3 tiene más proximidad con las CCs que con los basófilos (Falcone et al., 2018).

Las RBL-2H3 han sido comúnmente usadas para estudios de interacción IgE/FcεRI y las vías de señalización de la desgranulación (Passante & Frankish, 2009) debido a que presentan muchas ventajas en comparación con otros modelos celulares; entre las cuales destaca que se cultivan fácilmente y que se pueden obtener grandes cantidades de células en poco tiempo (Falcone et al., 2018). Otras características importantes de las células RBL-2H3, es que: comparten la propiedad de adherencia con las CCs del humano, son genéticamente manipulables y pueden ser transfectadas por métodos convencionales; además de que los resultados obtenidos de estas células pueden ser reproducidos en otras preparaciones de CCs. Sin embargo, el mecanismo de secreción de TNF en respuesta al LPS en este tipo celular no se conoce con detalle y sigue siendo controversial. Diversos estudios sugieren que las células RBL-2H3 no secretan TNF en respuesta al LPS debido a la ausencia de moléculas para la señalización del TLR-4 como CD14 o MD-2 que son necesarios para el reconocimiento del LPS por el TLR-4 (Passante et. al., 2009 SUPPL.1; Passante & Frankish, 2010). Contrariamente, otro grupo de investigación reportó que este tipo celular libera TNF pero no IL-13 en respuesta al LPS (Gon et.al., 2005).

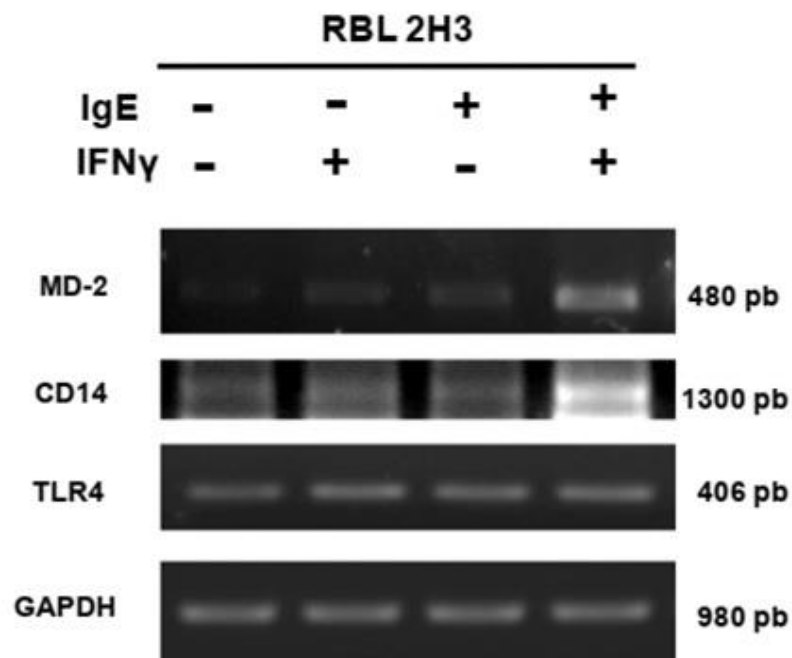
## 2. ANTECEDENTES

En nuestro laboratorio se demostró que el TNF preformado, en BMMCs, se encuentra en vesículas decoradas con VAMP3. También se encontró que esta proteína forma agregados en la membrana plasmática en respuesta al LPS (Martín-Ávila et al., 2016). Otro estudio hecho por Tiwari y colaboradores (2008) demostró que el TNF colocaliza con VAMP3 en CCs estimuladas con IL-1 $\beta$  y que esta proteína parece aumentar en CCs deficientes de VAMP8 (Tiwari et al., 2009). Estos estudios *in vitro* demuestran la posible participación de VAMP3 en la secreción de TNF. Sin embargo, existen pocos estudios realizados *in vivo* que analicen la participación de las proteínas SNAREs en el proceso secretor de TNF en CCs. Para este fin, se pueden utilizar los ratones Wsh mediante un modelo murino de endotoxemia por LPS (estandarizado en nuestro laboratorio).

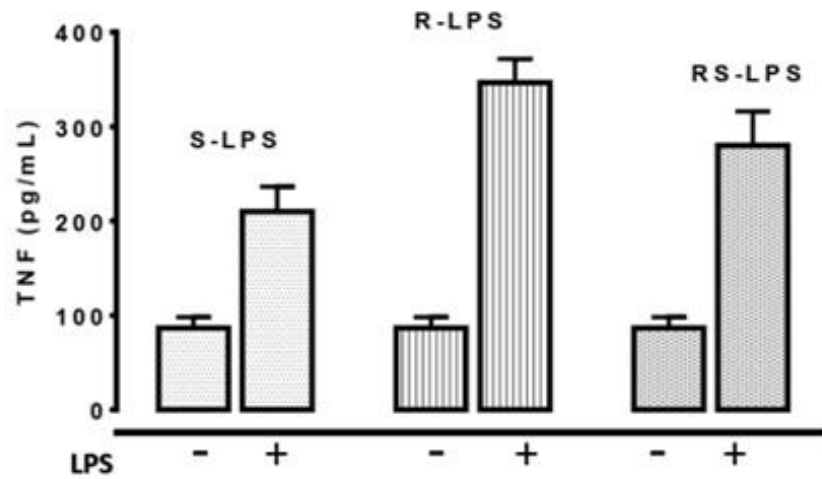
Sabemos que en los ratones WT (C57BL/6J), la secreción máxima de TNF ocurre 1 h después de la administración de LPS; mientras que los ratones Wsh son incapaces de secretar TNF y los ratones Wsh, reconstituidos con BMMCs provenientes de animales C57BL/6J, recuperarán su capacidad de responder al LPS y secretar TNF. Debido a los antecedentes *in vitro* y contando con un buen modelo *in vivo* que permita ver la participación exclusiva de las CCs, se quiso evaluar la participación de la proteína vesicular VAMP3 en la secreción de TNF en el modelo *in vivo* de endotoxemia utilizando como herramienta farmacológica un RNA pequeño de interferencia (siRNA).

Por otra parte, ya se ha estudiado la participación de algunas SNAREs en la secreción de mediadores inflamatorios utilizando la línea celular RBL-2H3 (Paumet et al., 2000). A pesar de que, diversos estudios han demostrado que son incapaces de responder al LPS debido a que no expresan las moléculas accesorias necesarias para la correcta activación del receptor TLR-4 (Passante et al., 2009; Passante & Frankish, 2010), en nuestro laboratorio se probaron varias condiciones de cultivo celular y se encontró que cuando las células se sensibilizan con IgE e IFN- $\gamma$  aumentan los niveles de expresión del

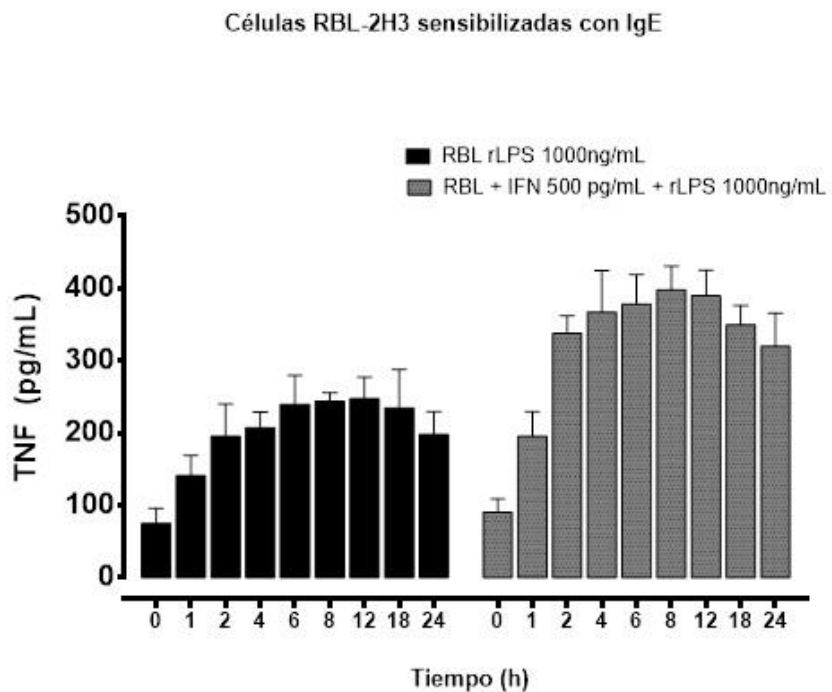
correceptor CD-14 y de la molécula adaptadora MD-2 (figura 11), polarizándolas hacia un fenotipo proinflamatorio capaz de responder al quimiotipo r del LPS (figura 12) y secretar TNF desde la primera hora de estimulación (figura 13). Gracias al desarrollo de este modelo, también evaluamos el papel de VAMP3 y VAMP8 *in vitro*, ya que, aunque se ha demostrado que la secreción de TNF es independiente de VAMP8 (en BMMCs), se sabe que puede existir un solapamiento de las funciones de las VAMPs, por lo tanto podrían tener vías de secreción en común (Hong, 2005).



**Figura 11.** Aumento en la expresión de CD14 y de MD-2 cuando las células RBL-2H3 son sensibilizadas con IgE más IFN- $\gamma$  (Ibarra-Sánchez, datos no publicados).



**Figura 12.** Secreción de TNF en células RBL-2H3 sensibilizadas y estimuladas con diferentes quimiotipos de LPS, donde se ve una mayor secreción de esta citocina cuando se utiliza el quimiotipo rugoso del LPS (Ibarra-Sánchez, datos no publicados).



**Figura 13.** La sensibilización con IgE y con IFN- $\gamma$  aumenta la secreción de TNF en células RBL-2H3 estimulada por rLPS a diferentes tiempos (Ibarra-Sánchez, datos no publicados).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las CCs secretan una gran cantidad de mediadores inflamatorios importantes en procesos fisiológicos y patológicos. Sin embargo, no se conoce el proceso detallado de tráfico vesicular y las proteínas específicas que llevan a la liberación de estos mediadores. Por lo tanto, conocer las proteínas encargadas de la liberación de un mediador específico nos permitirá identificar blancos terapéuticos para inhibir selectivamente la liberación de mediadores en las CCs.

### 4. HIPÓTESIS

**Hipótesis 1.** La proteína VAMP3 participará en la secreción de TNF estimulada por LPS en un modelo *in vivo* de endotoxemia.

**Hipótesis 2.** Las proteínas VAMP3 y VAMP8 participarán de manera diferencial en la secreción de TNF estimulada por LPS en las células RBL-2H3 polarizadas hacia un fenotipo proinflamatorio.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

Evaluar la participación de las proteínas VAMP3 y VAMP8 en la secreción de TNF estimulada por LPS en un modelo *in vivo* de endotoxemia y en un modelo de células cebadas inmortalizadas.

### **5.2. Objetivos particulares**

1. Evaluar la participación de VAMP3 en la secreción de TNF estimulada por el quimiotipo rugoso del LPS (rLPS) en un modelo *in vivo* de endotoxemia.
2. Obtener cultivos de las células RBL-2H3 que sean funcionales.
3. Caracterizar la cinética de secreción de TNF en respuesta al LPS en células RBL-2H3.
4. Analizar la colocalización de VAMP3 y VAMP8 con TNF en las RBL-2H3 estimuladas con LPS.
5. Inhibir la síntesis de VAMP3 y VAMP8 en células RBL-2H3 utilizando un siRNA específico.
6. Caracterizar la secreción de TNF en respuesta al LPS en células transfectadas con el siRNA de VAMP3 y VAMP8.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Animales**

Se utilizaron ratones C57BL/6J sexo indistinto (25-35 g), ratones hembra (20-30 g) carentes de células cebadas con el mismo fondo genético C57BL/6J-*Kit<sup>Wsh/Wsh</sup>* (Wsh) y ratones reconstituidos (Wsh Rec). Los animales se mantuvieron con ciclos 12/12 de luz-obscuridad, temperatura ( $23 \pm 2$  °C) y humedad relativa controladas, y con acceso libre a agua y comida. Todos los procedimientos llevados a cabo fueron aprobados por el Comité Institucional de Ética del Cinvestav y se utilizaron los protocolos No. 0074-13 y No. 0075-13.

### **6.2. Reconstitución de los ratones Wsh**

Los animales Wsh fueron reconstituidos con  $2 \times 10^6$  BMBCs de 4 a 6 semanas de edad, las cuales fueron lavadas y resuspendidas en buffer Tyrode's sin albúmina (ver anexo I) y posteriormente fueron inyectadas directamente en el peritoneo de los ratones. Después de cuatro semanas, los animales fueron sometidos al modelo de endotoxemia y se cuantificó el TNF de los lavados peritoneales mediante la técnica de ELISA.

### **6.3. Modelo murino de endotoxemia y lavados peritoneales**

Los diferentes grupos de ratones fueron administrados con rLPS a una dosis de 1 mg/kg vía i.p. y después de 1 h fueron sacrificados mediante inhalación de CO<sub>2</sub>. Para el caso del siRNA de VAMP3, 26 ng de este fueron administrados vía i.p. 18 h antes del reto, utilizando como vehículo un reactivo de transfección (TR) y un medio de transfección (TM) ambos de Santa Cruz. El volumen final administrado fue de 200 µL. Los lavados peritoneales se realizaron inyectando 2 mL de solución salina 0.9% (PiSa) en el peritoneo, se dio un ligero masaje por 20 seg, se abrió la cavidad peritoneal y se recuperó el líquido



(aproximadamente 1.5 mL). Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min en frío (4°C) y se separó el sobrenadante el cual se almacenó a -70 °C hasta su posterior uso. La cantidad de TNF liberada en el peritoneo fue determinada mediante la técnica de ELISA.

#### **6.4. Cultivo de las células RBL-2H3**

La línea celular RBL-2H3 se adquirió de la American Type Culture Collection (ATCC, # de catálogo CLR-2256). Las células se sembraron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB, 1mM de piruvato de sodio, 1% de aminoácidos no esenciales, 220 U/mL de penicilina, 220 µg/mL de estreptomina y 0.25 µg/mL de anfotericina B (todos de la marca Gibco, ver anexo I). Los cultivos permanecieron en incubación a una temperatura de 37°C y a una humedad relativa del 5% de CO<sub>2</sub>. Al obtenerse una confluencia aproximadamente del 80%, las células se despegaron con una solución de tripsina/EDTA al 0.05% (ver anexo I) y se sembraron en placas de 6 y 24 pozos a una confluencia del 10-20% y del 50-60% respectivamente, para utilizarlas en los diferentes experimentos.

#### **6.5. Ensayo de secreción de β-hexosaminidasa**

Se realizó una curva concentración respuesta utilizando diferentes concentraciones de antígeno (DNP-HSA, Sigma) y se midió el porcentaje de desgranulación mediante la cuantificación de la enzima β-hexosaminidasa. Para esto, las células RBL-2H3 se sembraron en placas de 24 pozos (1.2 x 10<sup>5</sup> células/pozo) y se sensibilizaron con 100 ng/mL de IgE anti-dinitrofenol (anti-DNP clona SPE-7, Sigma) durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron 2 veces con buffer de fosfatos (PBS) 1X (ver anexo I); a cada pozo se le agregó 100 µL de buffer Tyrode's-BSA (ver anexo I) y las células se estimularon con diferentes concentraciones de DNP-HSA (1, 3, 9, 27, 81 y 243 ng/mL) o con 1 µM de PMA/A23187 (control positivo) durante 30

min. La cuantificación de la  $\beta$ -hexosaminidasa se realizó midiendo la hidrólisis del sustrato para esta enzima, el p-nitrofenol-N-acetil-  $\beta$ -D-glucosaminido (p-NAG, Sigma), ya que esta reacción (enzima-sustrato) provoca la formación de un compuesto que emite un color y que es directamente proporcional a la enzima liberada. Para esto, en una placa de 96 pozos se colocaron 40  $\mu$ L/pozo de p-NAG seguidos de 60  $\mu$ L de sobrenadante de cada muestra o el lisado de las células utilizando 200  $\mu$ L de TritónX-100 (Sigma) al 0.5% para obtener el 100% de desgranulación. La placa se incubó durante 1 h a 37°C y, posteriormente, se agregaron 120  $\mu$ L/pozo de solución stop ( $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ ). Finalmente, la absorbancia de cada muestra se midió por espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro de placa (Tecan SUNRISE) a una longitud de onda de 405 nm. El porcentaje de desgranulación se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de desgranulación} = \frac{(\text{Densidad óptica de la muestra})(100)}{\text{Densidad óptica del control tratado con tritón}}$$

## 6.6. Cuantificación de TNF mediante ELISA

En placas de 24 pozos se sembraron  $1.2 \times 10^5$  células/pozo y se sensibilizaron con 100 ng/mL de anti-DNP durante 24 h más 500 pg/mL de IFN- $\gamma$  (PeproTech) por otras 24 h (**protocolo de sensibilización**). Transcurrido este tiempo, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X y se retaron con 1  $\mu$ g/mL de rLPS de *Salmonella entérica* (serotipo Minnesota Re 595, Sigma). Los sobrenadantes fueron recolectados a diferentes tiempos (1, 2, 4 y 6 h de estimulación con rLPS) y se tomó como secreción basal aquellas células que no fueron retadas con rLPS. El TNF se cuantificó utilizando 200  $\mu$ L de sobrenadante y siguiendo el procedimiento incluido en el kit de ELISA (PeproTech). Para cada determinación se corrió una curva patrón y los valores fueron expresados en pg/mL.

## 6.7. Inmunocitoquímica

Cinco mil células se sembraron en portaobjetos redondos de 12 mm de diámetro, previamente esterilizados con etanol al 70% y luz UV, los cuales fueron depositados en una placa de 24 pozos. Las células se incubaron de 18-24 h para permitir que se adhirieran al portaobjetos y fueron sometidas al protocolo de sensibilización. Posteriormente, las células se preincubaron 3 h con TAPI a una concentración final de 50  $\mu$ M, esto para evitar que el TNF fuera liberado por las células. Transcurrido este tiempo, las células se estimularon con rLPS (1  $\mu$ g/mL) durante 2 h y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% (ver anexo I) por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron con PBS 1X para retirar el exceso de PFA, se bloquearon con 200  $\mu$ L de la solución de bloqueo que contiene 3% de BSA (Sigma), 5% de suero de burro (Biowest) y 0.1% de Tween -20 (Sigma) y se dejaron incubar por 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se retiró la solución de bloqueo y se agregó el anticuerpo primario anti-VAMP3 (GeneTex) o anti-VAMP8 (donado por el Dr. Ulrich Blank, INSERM) y anti-TNF (Santa Cruz) a una dilución de 1:200, 1:300 y 1:100, respectivamente, y se dejó incubar toda la noche a 4°C. Después se lavó 5 veces con PBS 1X y se agregaron los anticuerpos secundarios anti-ratón (para VAMP3 o VAMP8) y anti-cabra (para TNF), los cuales están acoplados a una fluoróforo (AF568 y AF488, respectivamente), los dos de ThermoFisher. Los anticuerpos secundarios se dejaron incubar 2 h a temperatura ambiente. Nuevamente se lavó con PBS 1X por 5 ocasiones, se le agregó el marcador de núcleos (DAPI), se dejó incubar durante 5 min protegido de la luz, se lavó 5 veces con PBS 1X y 2 veces con agua miliQ. Posteriormente, los portaobjetos se sacaron del pozo de la placa y se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente se adicionó el medio de montaje (DABCO) y se selló con esmalte transparente. Las laminillas se observaron en un microscopio confocal Zeiss equipado con un objetivo de inmersión de 63X. Una vez obtenidas las imágenes, se analizó la colocalización de las dos marcas mediante el coeficiente de Manders utilizando el software Fiji-ImageJ-NIH acoplado con el plugging JaCoP (Bolte &

Cordelieres, 2006). Este coeficiente permite medir el grado de colocalización entre los píxeles de los dos colores provenientes de cada canal (Manders et al., 1993). El análisis arroja dos coeficientes: uno que representa la fracción de colocalización del canal 1 (por ejemplo rojo) con el canal 2 (verde); y otro que representa la fracción de colocalización entre el canal 2 (verde) y el canal 1 (rojo). En nuestro caso, se utilizó el coeficiente de colocalización entre TNF y VAMP3 o VAMP8; es decir, en qué proporción los píxeles verdes (TNF) colocalizaron con los píxeles rojos (VAMPs).

### **6.8. Transfección de siRNAs por el método de lipofección**

En placas de 6 pozos se sembraron  $1.2 \times 10^5$  células/pozo y se dejaron proliferar de 18-24 h. Posteriormente, las células fueron sometidas al protocolo de sensibilización descrito anteriormente. Transcurrido este tiempo, se les retiró el medio y se lavaron 2 veces con PBS 1X. Para la transfección se siguió el procedimiento descrito en el *siRNA Transfection Protocol* (Santa Cruz Biotechnology, Inc) incluido en el kit que consiste, básicamente, en incubar a las células por 4 h con el TM, el TR y el siRNA específico para VAMP3 (Ambion, #catálogo 186990) o VAMP8 (Ambion, #catálogo 101472) o con un siRNA irrelevante o Scrambled (Santa Cruz) que no inhibe la síntesis de ninguna proteína. Transcurrido este tiempo, a cada pozo se le adicionó 1 mL de medio DMEM al 20% en SFB y 2X de antibiótico (sin remover la mezcla de la transfección) y se dejó incubar por 18 h. Después se retiró todo el medio y se reemplazó por 1 mL de medio nuevo (DMEM al 10% en SFB) y se dejó incubar durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las células se estimularon con rLPS durante 2 h y se recolectaron los sobrenadantes para determinar la secreción de TNF mediante ELISA. Finalmente, las células fueron lisadas utilizando 500  $\mu$ L de buffer Laemmli 1X (ver anexo I) para determinar la expresión de VAMP3 y VAMP8 mediante la técnica de Western Blot.

## **6.9. Western Blot**

Los extractos totales fueron sometidos a ebullición durante 15 min, posteriormente se cargaron 10 µL de las muestras y las proteínas se separaron por desnaturalización en un gel de poliacrilamida a una concentración del 16% utilizando un buffer de corrida TRIS-glicina-SDS (ver anexo I) y las siguientes condiciones de electroforesis: 100 V y 50 mA. Las muestras se dejaron correr aproximadamente 2 h y, posteriormente, se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, PerkinElmer catálogo NEF1002001PK). El sándwich de transferencia se hizo de acuerdo al protocolo de Invitrogen, utilizando un amortiguador TRIS-glicina-metanol (ver anexo I). La transferencia se realizó a 20 Voltios y amperaje abierto durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo, la membrana se bloqueó con leche baja en grasa (Svelty de Nestlé) al 5% durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación constante. La leche se preparó en solución amortiguadora TBS-T (ver anexo I). Posteriormente, la membrana se lavó con TBS-T para retirar el exceso de leche y se incubó toda la noche con el anticuerpo primario anti-VAMP3 (GeneTex) o anti-VAMP8 (donado por el Dr. Ulrich Blank, Universidad de Paris, INSERM), a una dilución de 1:10 000, ambos hechos en conejo. Al día siguiente la membrana se lavó 3 veces con TBS-T cada 10 min y se le agregó el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, Jackson ImmunoResearch), ambos a una dilución de 1:10 000. La membrana se incubó por 1 h a temperatura ambiente y en agitación constante y después se lavó nuevamente 3 veces con TBS-T. Finalmente, las proteínas de interés se detectaron utilizando un kit de quimioluminiscencia (Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate) siguiendo las especificaciones del fabricante.

La imagen de las bandas se obtuvo exponiendo la membrana a placas de rayos X KODAK y posteriormente se analizó utilizando el programa GelQuant Express (ThermoFisher) utilizando como control de carga la expresión de la proteína  $\beta$ -actina, la cual se obtuvo incubando la misma membrana con el anticuerpo primario anti-  $\beta$ -actina (Santa Cruz) hecho en ratón y posteriormente se puso el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con la HRP (Jackson ImmunoResearch) ambos a una dilución 1:10 000.

### **6.10. Análisis estadístico**

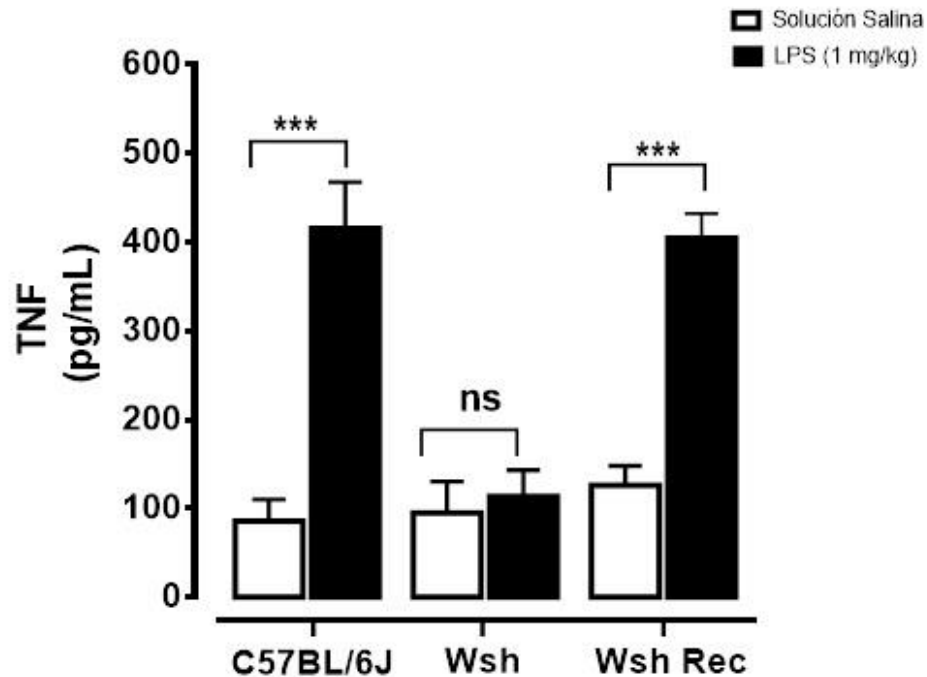
Todos los experimentos *in vivo* fueron realizados en al menos 4 ratones, excepto el experimento del siRNA de VAMP3 con los ratones *Wsh Rec* donde se tiene una  $n=2$ . Con respecto a los experimentos *in vitro*, se hicieron al menos tres experimentos independientes con células RBL-2H3 de diferentes pasajes. Los datos obtenidos se graficaron como el promedio  $\pm$  el error estándar (SEM) y se analizaron con diferentes pruebas estadísticas. Para los datos que cumplieron con la prueba de normalidad se utilizó el ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnet, así como la prueba t de Student no pareada; mientras que, los datos que no presentaron una distribución normal, se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney. En todos los casos se consideró significativa una  $p<0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1. La secreción de TNF en un modelo *in vivo* de endotoxemia por LPS depende exclusivamente de las CCs

Para evaluar la participación de las VAMPs *in vivo* se utilizó un modelo de endotoxemia inducido por el quimiotipo “r” del LPS, el cual no había sido probado en nuestro laboratorio. Para esto, se utilizaron 3 grupos de ratones: los C57BL/6J (WT), los ratones carentes de CCs con el mismo fondo genético C57BL/6J-*Kit<sup>Wsh/Wsh</sup>* (Wsh) y los ratones reconstituidos (Wsh Rec).

Lo primero que se hizo fue demostrar que la secreción de TNF depende exclusivamente de las CCs en nuestro modelo. En la **figura 14** se observa que los ratones WT responden al rLPS y secretan una cantidad de TNF significativamente mayor que los ratones que fueron administrados únicamente con solución salina ( $415.8 \pm 51.9$  vs  $86.2 \pm 24.0$  pg/mL, respectivamente). En el caso de los ratones Wsh, no se observó diferencia significativa en la liberación de TNF, ya que ambos grupos secretaron cantidades similares (basal =  $95.4 \pm 35.1$  pg/mL y estimulados =  $113.8 \pm 29.6$  pg/mL). Finalmente, en los ratones Wsh Rec se restauró la respuesta al rLPS y secretaron  $404.8 \pm 27.3$  pg/mL de TNF, esta cantidad es muy similar a la de los ratones WT ( $415.8 \pm 51.9$  pg/mL). Por lo tanto, podemos decir que el modelo de endotoxemia por LPS funciona para ver exclusivamente la participación de las CCs en la secreción de TNF en el peritoneo del ratón.



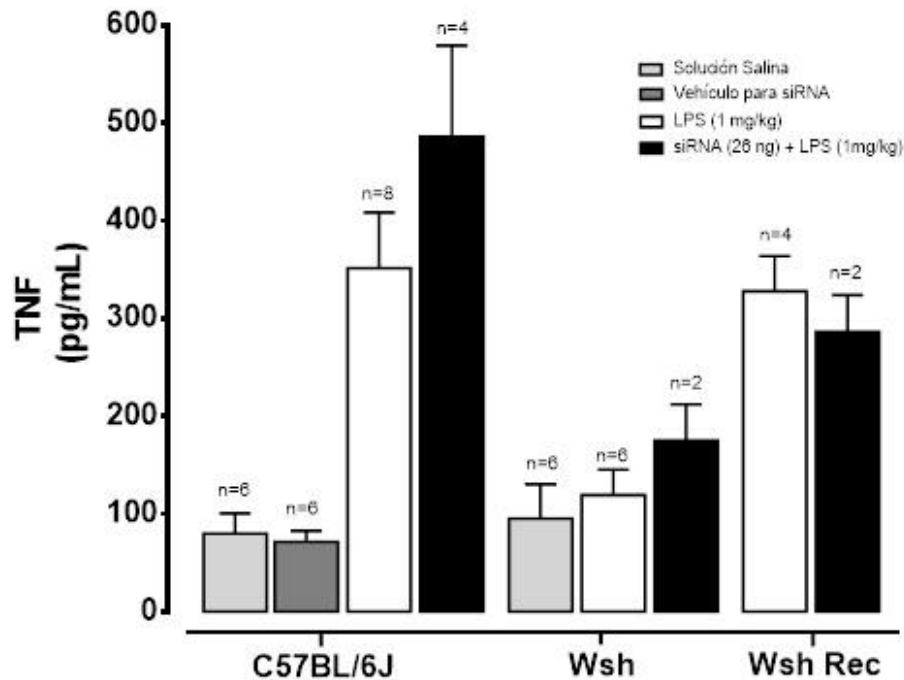
**Figura 14.** Modelo *in vivo* de endotoxemia inducido por rLPS. Los ratones fueron retados con solución salina o con rLPS a una dosis de 1 mg/kg. Una hora después, fueron sacrificados por inhalación de CO<sub>2</sub> y se realizaron los lavados peritoneales en los cuales se determinó la concentración de TNF mediante la técnica de ELISA. Los datos son representados como el promedio  $\pm$  SEM (n=6). \*\*\*p<0.001 vs ratones administrados con solución salina, mediante una prueba t de Student no pareada, ns = no existe diferencia significativa entre los grupos señalados.

## 7.2. La administración *in vivo* del siRNA de VAMP3 no disminuyó la secreción de TNF en el peritoneo

Se realizó el modelo de endotoxemia por rLPS utilizando ratones a los que previamente se les administró, vía i.p., el siRNA de VAMP3. En la **figura 15** se observa que la administración de SSI y del vehículo del siRNA no induce un aumento en la secreción de TNF en los ratones WT; sin embargo, cuando son retados con rLPS, la secreción de TNF aumenta significativamente pero no es diferente en comparación con los animales tratados con siRNA específico de VAMP3 ( $351.7 \pm 57.6$  vs  $486.1 \pm 93.0$  pg/mL, respectivamente).



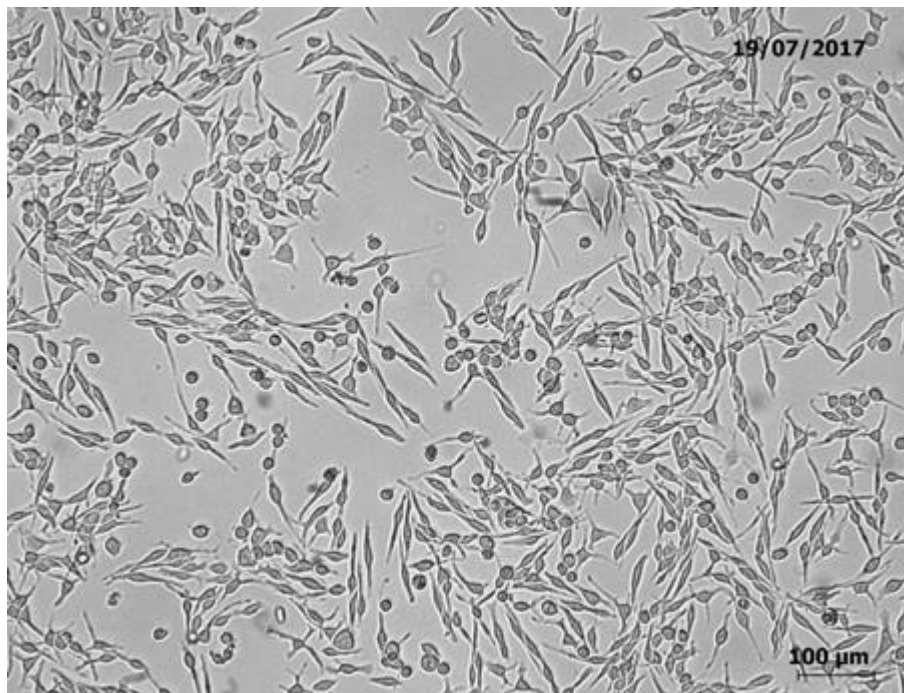
Como se esperaba, en los ratones Wsh no aumentó la secreción de TNF en ninguno de los tratamientos debido a que no tienen CCs. Por último, en los ratones Wsh Rec tampoco se observó una diferencia en la secreción de TNF entre los tratados con el vehículo (328.0 ± 36.1 pg/mL) o con el siRNA específico de VAMP3 (286.3 ± 26.7 pg/mL). Tanto en los animales WT como en los Wsh Rec tratados con el siRNA, se esperaba una disminución en la secreción de TNF, la cual no fue observada. Los resultados indican que VAMP3 no tiene una participación relevante en la secreción de TNF, al menos en nuestro modelo de endotoxemia inducido por rLPS, y contrasta con los resultados *in vitro* que se han reportado, donde parece ser VAMP3 la que está mediando la secreción de esta citocina.



**Figura 15.** Participación de VAMP3 en un modelo *in vivo* de endotoxemia inducido por la administración de rLPS. Los ratones fueron administrados con vehículo o con 26 ng el siRNA de VAMP3 por vía i.p. Transcurridas 18 h, los ratones fueron retados con solución salina o con rLPS (1 mg/kg de peso). Una hora después, se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub> y se realizaron los lavados peritoneales en los cuales se determinó la concentración de TNF mediante la técnica de ELISA. Los datos son representados como el promedio ± SEM. ns = no existe diferencia significativa entre los grupos señalados. Prueba t de Student no pareada y prueba de Mann-Whitney.

### 7.3. Las células RBL-2H3 responden a estímulos de la inmunidad adaptativa

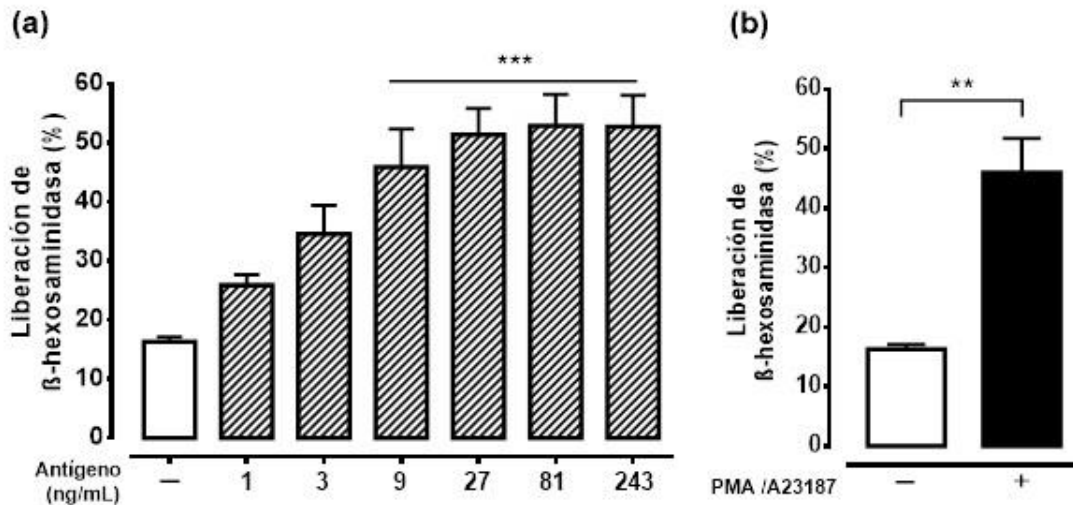
Debido a que no se observó la participación de VAMP3 en la secreción de TNF *in vivo*, se analizó en un modelo *in vitro* utilizando la línea celular RBL-2H3, la cual se cultivó como se describe en la sección 6.4 de materiales y métodos. En la **figura 16** se muestra una fotografía de las células, adheridas a la superficie de la placa de cultivo, donde se puede apreciar su morfología: forma alargada, estrellada o fusiforme (parecida a la de los fibroblastos) o también se pueden encontrar células redondeadas. Esto cumple con las especificaciones del certificado de análisis para esta línea celular.



**Figura 16.** Cultivo de células RBL-2H3 donde se pueden observar células alargadas, estrelladas y redondeadas. Fotografía tomada en un microscopio Leica (No. serie 381927) con un objetivo 10X.

Posteriormente, para evaluar la funcionalidad de las células, se realizó un ensayo de desgranulación midiendo la actividad de la enzima

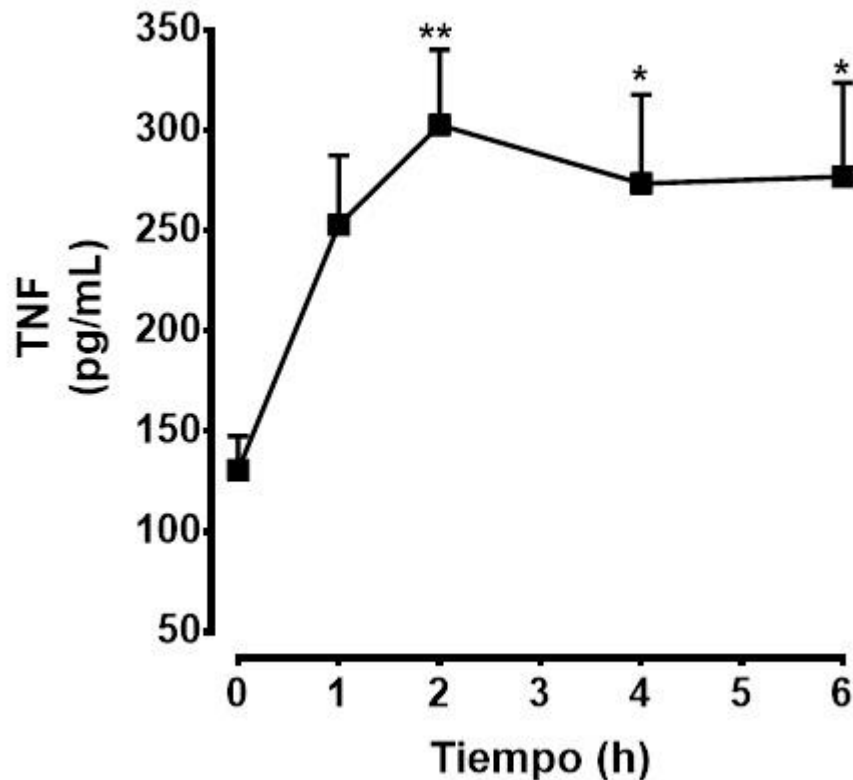
$\beta$ -hexosaminidasa. En la **figura 17a** se muestra la liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa después de la estimulación con el antígeno (DNP-HSA) a diferentes concentraciones y podemos observar que el aumento en la liberación de esta enzima es dependiente de la concentración del antígeno, observando una máxima desgranulación a la concentración de 81 ng/mL ( $52.8 \pm 5.3 \%$  vs  $16.3 \pm 0.8 \%$  sin antígeno) que ya no aumenta con la concentración de 243 ng/mL ( $52.7 \pm 5.3 \%$ ). En la **figura 17b** se utilizó otro estímulo: un ionóforo de calcio (A23187) y un activador de la PKC, el Forbol-miristatoacetato (PMA), que funcionan como control positivo del ensayo. Se puede observar que las células también responden a estos estímulos y liberan más del doble de la enzima ( $45.9 \pm 5.7 \%$ ) en comparación con el basal ( $16.3 \pm 0.8 \%$ ). Esto nos dice que las células RBL-2H3 son funcionales, ya que son capaces de responder a estímulos presentes en el medio.



**Figura 17.** Ensayo de desgranulación en células RBL-2H3. (a) Las células fueron estimuladas con diferentes concentraciones de antígeno (DNP-HSA) o (b) con PMA más A23187 (1  $\mu$ M) y después de 30 min se midió la liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*\*\* $p < 0.001$  y \*\* $p < 0.01$  vs basal (sin estímulo), mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett.

#### 7.4. Las células RBL-2H3 responden al LPS después de la sensibilización con IgE e IFN- $\gamma$

Para evaluar la secreción de TNF en las células RBL-2H3, éstas fueron sometidas al protocolo de sensibilización, como se describe en la sección 6.6 de materiales y métodos. En la **figura 18** se muestra la cinética de secreción de TNF en respuesta al rLPS en células sometidas al protocolo de sensibilización.



**Figura 18.** Cinética de secreción del TNF en las células RBL-2H3. Las células fueron sensibilizadas con IgE e IFN- $\gamma$  y se estimularon con 1  $\mu$ g/mL de rLPS a diferentes tiempos. La cantidad de TNF fue cuantificada en los sobrenadantes celulares utilizando la técnica de ELISA. Los datos son representados como el promedio  $\pm$  SEM de 9 experimentos independientes. \* $p$ <0.05 y \*\* $p$ <0.01 vs tiempo cero de estimulación con rLPS, mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett.

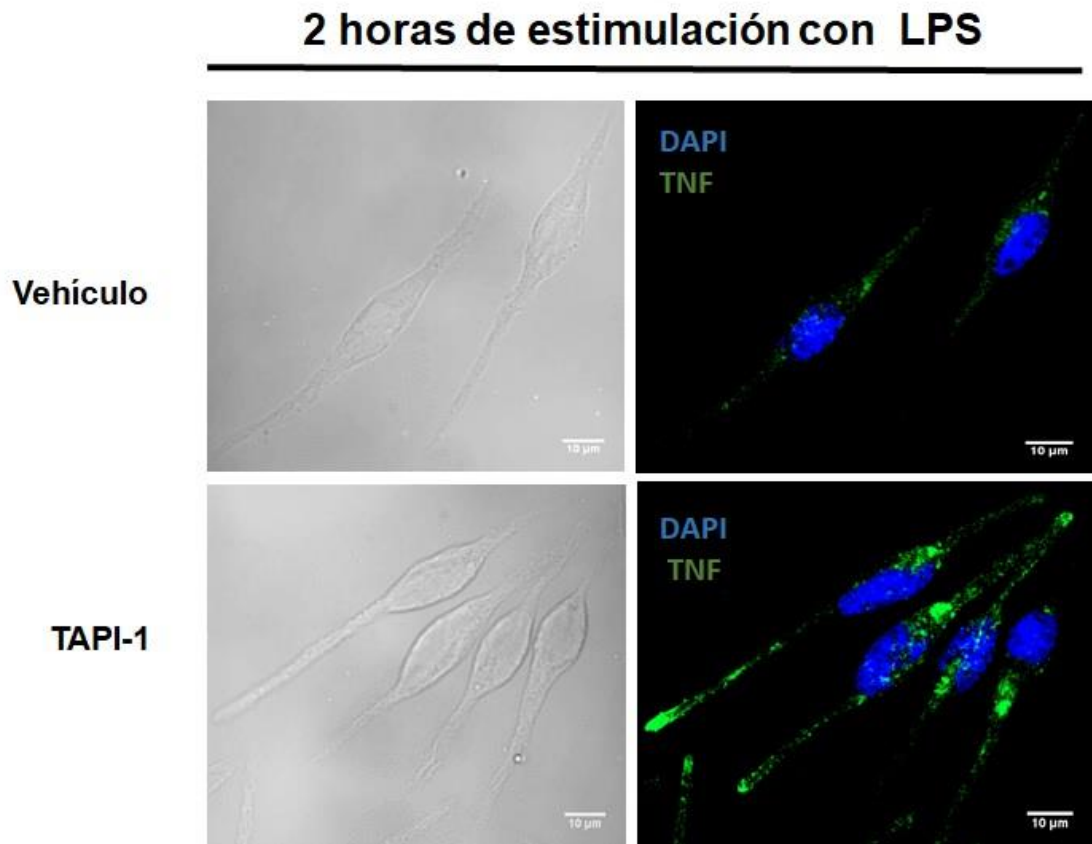
Como podemos observar, las células liberan TNF desde la primera hora de estimulación, pero hasta las 2 h de estimulación se obtiene un valor significativamente diferente en comparación con el basal ( $302.8 \pm 37.4$  pg/mL vs  $130.7 \pm 16.8$  pg/mL). Este aumento se mantiene hasta las 6 h de estimulación. Por lo tanto, podemos decir que las células RBL-2H3 son capaces de liberar TNF y que la máxima liberación ocurre a las 2 h de estimulación con rLPS.

### **7.5. El TNF colocaliza con VAMP3 y con VAMP8 en células RBL-2H3 estimuladas con LPS**

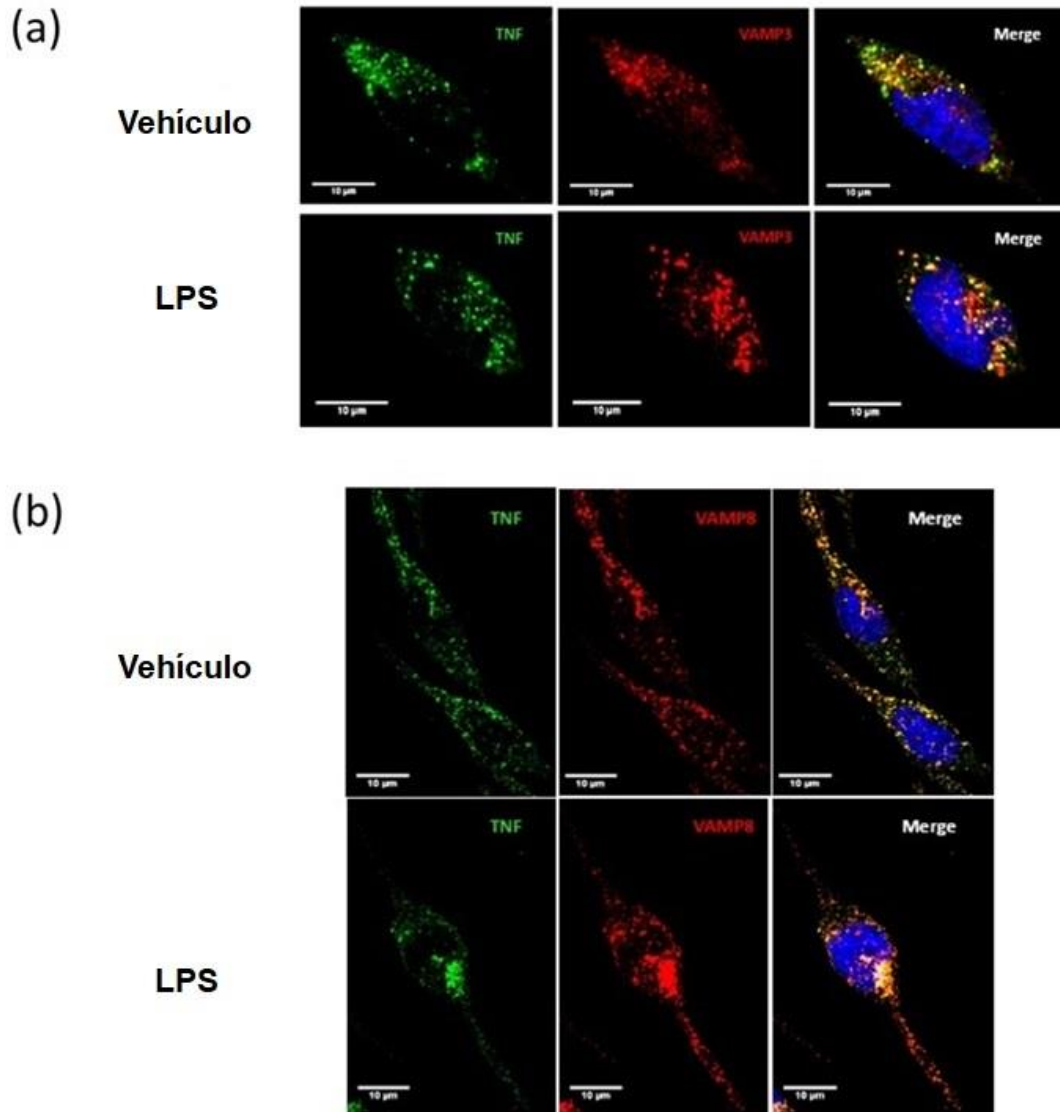
Una vez establecido el modelo para estudiar la secreción de TNF en las células RBL-2H3, se procedió a investigar si esta citocina se encontraba en vesículas VAMP3 o VAMP8 positivas. Para evitar que el TNF fuera liberado por las células, se utilizó un inhibidor de la TACE (TAPI-1) como se describe en la sección 6.7 de materiales y métodos. En la **figura 19** se muestra una imagen representativa de células RBL-2H3 preincubadas con vehículo o con TAPI-1 y posteriormente estimuladas con rLPS. Como se puede observar, el TAPI-1 permite que el TNF se quede dentro de la célula, al inhibir a la TACE que lo convierte en TNF soluble, lo cual no se observa cuando las células se preincuban únicamente con el vehículo.

En la **figura 20** se muestran imágenes representativas de células RBL-2H3 marcadas con un anticuerpo anti-VAMP3 o anti-VAMP8 (rojo) y con un anticuerpo anti-TNF (verde). Como se puede observar, el TNF colocaliza de manera parcial con VAMP3 en células no estimuladas y estimuladas con rLPS (**figura 20a**). Por otro lado, el TNF sí colocaliza de manera importante con VAMP8 en células no estimuladas y después de 2 h de estimulación con rLPS (**figura 20b**); en ambos casos, se ve una distribución de las proteínas a lo largo de toda la célula.

Particularmente, en el caso de las células estimuladas, podemos observar que VAMP8 y TNF, pero no VAMP3, se concentran en una estructura celular que presenta características similares a la conocida como nube perinuclear, la cual se encuentra estrechamente asociada con el retículo endoplasmático (Dellibovi-Raghelo & Althan-Bonnet, 2009).

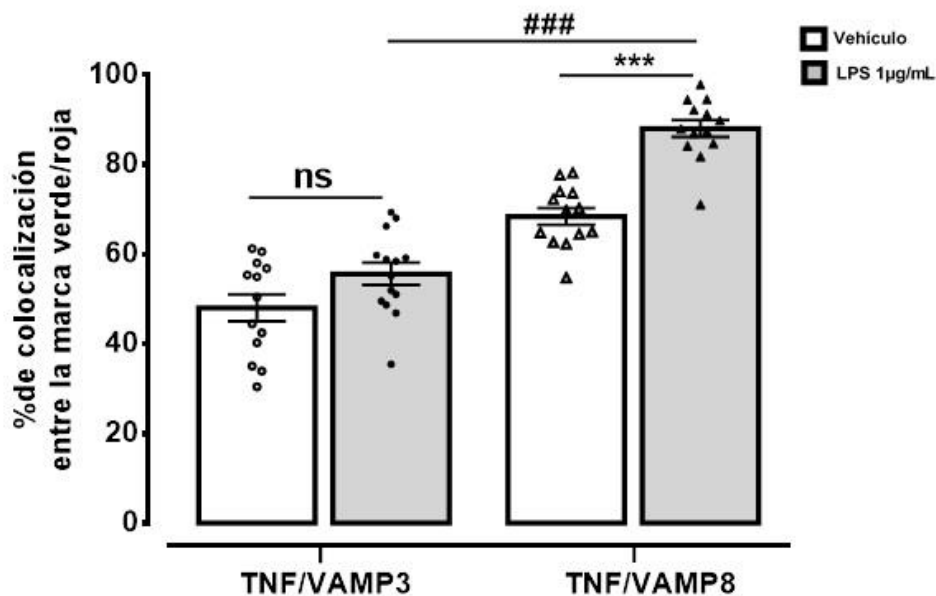


**Figura 19.** El uso del TAPI-1 permite visualizar la marca de TNF en el interior de la célula. Las células RBL-2H3 fueron preincubadas 3 horas con vehículo o con TAPI-1 (50  $\mu$ M) y estimuladas 2 h con rLPS (1 $\mu$ g/mL). Posteriormente se fijaron, se marcaron con un anticuerpo anti-TNF y fueron observadas por microscopía confocal. Se muestra una figura representativa de al menos 10 células analizadas de 3 experimentos independientes.



**Figura 20.** Inmunocitoquímica de las células RBL-2H3. Las células fueron estimuladas 2 h con rLPS o vehículo y marcadas con anti-VAMP3 (a) o anti-VAMP8 (b) y anti-TNF. Se muestran las imágenes representativas donde se puede observar que tanto VAMP3 como VAMP8 colocalizan con TNF (marca amarilla). Se observaron de 10-20 células por condición, de al menos 3 experimentos independientes.

En la **figura 21** se graficó el porcentaje de colocación de TNF con cada proteína VAMP. Como podemos observar, la colocación entre TNF/VAMP3 no se ve aumentada en células tratadas con vehículo o estimuladas con rLPS ( $48.1 \pm 3.0$  vs  $55.2 \pm 2.5$  %, respectivamente). Sin embargo, el TNF colocaliza un  $68.5 \pm 1.9$  % con VAMP8 en condiciones basales, y esta colocación aumenta significativamente cuando las células son estimuladas con rLPS ( $88.0 \pm 1.9$  %). Estos datos nos sugieren que los gránulos que contienen TNF son VAMP3 y VAMP8 positivos en células RBL-2H3 no estimuladas y estimuladas con rLPS, siendo más importante la colocación entre TNF y VAMP8.



**Figura 21.** Cuantificación de la colocación entre TNF/VAMP3 y TNF/VAMP8. Las células RBL-2H3 marcadas con VAMP3, VAMP8 y TNF, fueron analizadas utilizando el coeficiente de Manders (para mayores detalles ver la sección 6.7 de materiales y métodos) y se determinó el porcentaje de colocación entre el TNF con cada VAMP, en células estimuladas con vehículo o con rLPS durante 2 h. Se analizaron de 10-20 células de al menos 3 experimentos independientes. Los datos son representados como el promedio  $\pm$  SEM y la dispersión de todos los datos, cada punto es el valor de colocación de una célula. \*\*\* $p < 0.001$  vs vehículo y ### $p < 0.001$  vs células estimuladas con rLPS, mediante una prueba t de Student no pareada, ns = no existe diferencia significativa entre los grupos señalados.



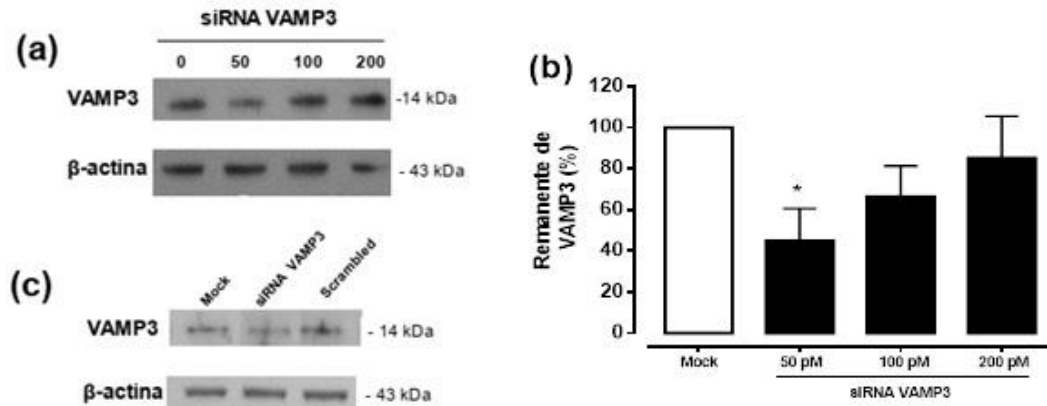
## 7.6. El empleo de siRNAs disminuye la expresión de VAMP3 y VAMP8

### 7.6.1. Inhibición de la expresión de VAMP3

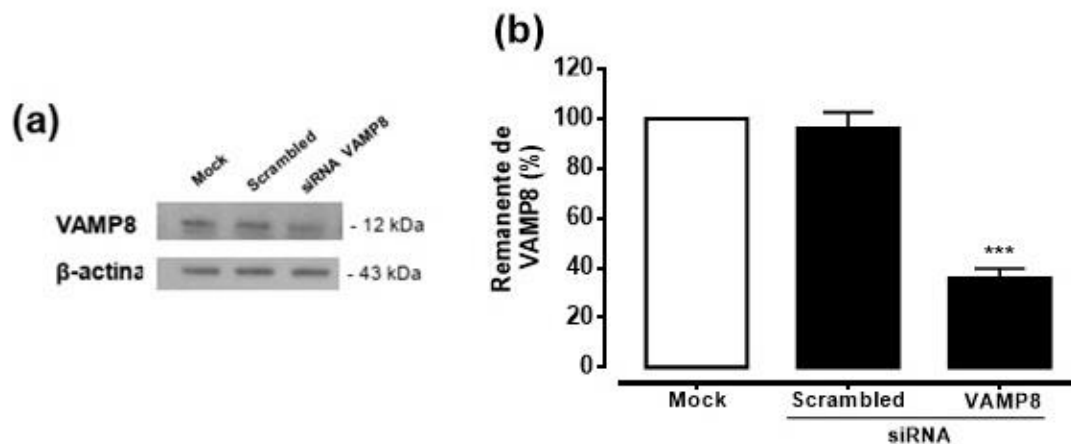
Otro objetivo particular que nos planteamos fue inhibir la síntesis de VAMP3 y VAMP8 mediante la transfección de un siRNA específico para dichas proteínas. En la **figura 22a** se muestra un blot representativo de la inhibición de VAMP3 con diferentes concentraciones del siRNA, siendo la concentración de 50 pM la que inhibe la expresión de la proteína de interés. Contrario a lo esperado, con las concentraciones más altas no se observó este efecto. En la **figura 22b** se muestra el análisis de la densitometría de cada banda tomando como 100% de la expresión de VAMP3 el tratamiento únicamente con el vehículo (mock) y graficando el porcentaje de proteína remanente utilizando como control de carga la expresión de  $\beta$ -actina. Podemos observar que la concentración de 50 pM disminuye la expresión de la proteína aproximadamente en un 50 % mientras que en las otras dos concentraciones empleadas no se ve una disminución significativa en la expresión de VAMP3 con respecto al mock. En la **figura 22c** se muestra un blot representativo donde se utilizó un siRNA irrelevante (Scrambled) como control de la transfección, el cual no disminuyó la expresión de VAMP3 en comparación con el siRNA específico.

### 7.6.2. Inhibición de la expresión de VAMP8

Para el caso de VAMP8, en la **figura 23a** se muestra un blot representativo donde podemos observar que también hay una disminución en su expresión cuando se utiliza el siRNA específico, y que el siRNA irrelevante (Scrambled) no modifica la expresión de dicha proteína en comparación con el mock. En la **figura 23b** se muestra una gráfica con el análisis densitométrico de las bandas, donde podemos observar que con el siRNA específico la expresión de VAMP8 disminuye aproximadamente un 70 %, mientras que con el siRNA Scrambled disminuye únicamente un 3 %.



**Figura 22.** Inhibición de VAMP3 empleando un siRNA específico. Las células fueron transfectadas con vehículo (Mock) o con diferentes concentraciones de siRNA de VAMP3. Después de 48 h de transfección, fueron lisadas y analizadas mediante Western Blot. Se muestra un blot representativo de la expresión de VAMP3/ $\beta$ -actina (a) y el análisis de la densitometría de las bandas (b), así como un blot donde se utilizó como control de la transfección un siRNA Scrambled que no inhibe la síntesis de ninguna proteína (c). Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs el mock, mediante una prueba t de Student.

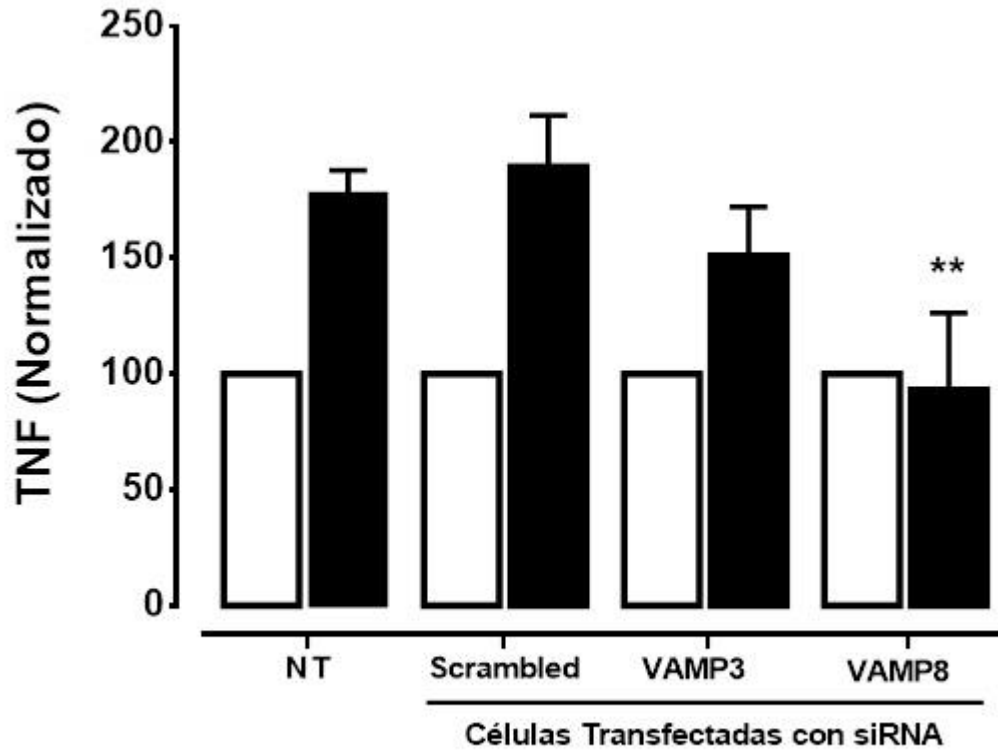


**Figura 23.** Inhibición de VAMP8 empleando un siRNA específico. Las células fueron transfectadas con vehículo (Mock), con 200 pM del siRNA de VAMP8 o con el siRNA Scrambled. Después de 48 h de transfección fueron lisadas y analizadas mediante Western Blot. Se muestra un blot representativo de la expresión de VAMP8/ $\beta$ -actina (a) y el análisis de la densitometría de las bandas (b). Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*\*\* $p < 0.001$  vs el mock, mediante una prueba t de Student.

## **7.7. VAMP8 participa en la secreción de TNF en células cebadas estimuladas con LPS**

Para evaluar la participación de VAMP8 y VAMP3 en la secreción de TNF se realizó un experimento de secreción de TNF después de 2 h de estimulación con rLPS en células previamente transfectadas con un siRNA Scrambled, el siRNA de VAMP3 o el siRNA de VAMP8.

En la **figura 24** podemos observar que la secreción de TNF en respuesta al rLPS en células no transfectadas es el doble en comparación con las células que no fueron retadas con rLPS y observamos el mismo comportamiento con las células que fueron transfectadas con el siRNA Scrambled. Sin embargo, cuando las células se transfectan con el siRNA de VAMP8 o de VAMP3 podemos observar que, después del reto con rLPS, tienden a disminuir la cantidad de TNF secretado, siendo el *knockdown* de VAMP8 el que disminuye la secreción de TNF de manera significativa. Por lo tanto, podemos decir que VAMP8 es más importante para la secreción de TNF en células RBL-2H3 estimuladas con rLPS.



**Figura 24.** Participación de VAMP3 y de VAMP8 en el proceso de secreción de TNF. Las células RBL-2H3 sin transfectar o transfectadas con un siRNA Scrambled o un siRNA específico para VAMP3 o VAMP8, fueron retadas con rLPS durante 2 h y la cantidad de TNF secretado fue medida mediante la técnica de ELISA. La comparación se hizo normalizando la cantidad de TNF liberado por las células que no se estimularon con rLPS (barras blancas) con las que sí fueron estimuladas (barras negras). Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*\* $p < 0.01$  vs las células estimuladas con rLPS pero que no fueron transfectadas, mediante una prueba t de Student.

## 8. DISCUSIÓN

Las proteínas involucradas en la secreción de mediadores inflamatorios por las células cebadas son un campo de estudio muy activo debido a su relevancia tanto en biología celular como en la posible terapéutica de enfermedades crónicas. En el presente trabajo se estudió la participación de dos proteínas de la familia de las SNAREs, específicamente las que están presentes en los gránulos o vesículas de las células cebadas, que son VAMP3 y VAMP8. Los principales hallazgos son los siguientes: 1) La administración *in vivo* del siRNA de VAMP3 no disminuyó la secreción de TNF en el peritoneo de los ratones sometidos al modelo de endotoxemia por rLPS; 2) VAMP8 participa en la secreción de TNF estimulada por LPS en la línea celular RBL-2H3 sometida a un protocolo de sensibilización con IgE e IFN- $\gamma$ ; 3) VAMP3 se asocia a vesículas que contienen TNF en esa línea celular, pero su inhibición en un 50% con un siRNA específico, no tuvo efecto en la secreción de tal citocina. Además, recolectamos evidencia que apoya la idea de que los siRNAs pueden ser usados como agentes terapéuticos para inhibir la secreción de citocinas específicas y, en el transcurso de esta investigación, se desarrolló un protocolo de sensibilización capaz de modificar el fenotipo secretor de las RBL-2H3, dando un mayor soporte a la idea de la gran plasticidad de las células cebadas.

A continuación se discutirán con más detalles los resultados más relevantes:

*La administración in vivo del siRNA de VAMP3 no disminuyó la secreción de TNF en el peritoneo de los ratones sometidos al modelo de endotoxemia por rLPS*

A pesar de los antecedentes que muestran una clara colocalización entre TNF y VAMP3 en BMMCs estimuladas con LPS (Martín-Ávila et al., 2016), en este trabajo se encontró que VAMP3 no está relacionada con el proceso de secreción de esta citocina en nuestro modelo *in vivo* de endotoxemia por rLPS.

Como podemos observar en la figura 15, los animales que fueron tratados previamente con el siRNA de VAMP3 (una sola administración vía i.p.) y, posteriormente retados con rLPS, no disminuyeron la cantidad de TNF secretado en el peritoneo. Cabe resaltar que no se comprobó la disminución en la expresión de la proteína VAMP3, por lo tanto estos resultados solo nos dan una aproximación de que el siRNA de VAMP3 no tuvo ningún efecto en la secreción de TNF pero bajo nuestras condiciones de trabajo.

Existe poca información acerca de la administración exitosa de siRNAs por vía intraperitoneal, ya que, al ser una vía de administración sistémica, la biodisponibilidad del siRNA es menor (en comparación con una vía de administración local) y se requieren dosis mayores para obtener el efecto deseado. Además, en la cavidad peritoneal, el siRNA es más propenso a sufrir ataques por nucleasas y ser degradado antes de ejercer su efecto (Borna et al, 2014). Otra cosa importante que se debe considerar es el método de entrega, el cual permitirá la entrada eficaz del siRNA a la célula. En este estudio utilizamos liposomas, los cuales han sido ampliamente utilizados en transfecciones *in vitro*. Sin embargo, para administraciones *in vivo*, los liposomas han demostrado ser menos efectivos y más tóxicos (Higuchi et al 2010). Una estrategia podría ser utilizar otro reactivo de transfección como los polímeros, los cuales muestran una mayor eficiencia de transfección y menos toxicidad en muchos tipos celulares, por lo que pueden tener un mayor potencial para la administración de siRNAs *in vivo*. Con respecto a este método de entrega, Howard y colaboradores demostraron que la inyección i.p. de un siRNA para TNF contenido en un polímero (chitosan) disminuyó la respuesta inflamatoria en un modelo murino de artritis. Otro estudio hecho por Sørensen y colaboradores demuestra también, la administración exitosa vía i.p. de un siRNA para TNF utilizando un modelo murino de endotoxemia inducido por LPS. Los autores reportan una disminución en los niveles de TNF, pero no de IL-1 $\alpha$ , cuando se utiliza el siRNA específico. Además, comprueban la disminución del mensajero de TNF en las células del peritoneo.

Estos estudios nos hablan del potencial terapéutico que puede tener la administración de siRNAs por vía intraperitoneal. Cabe destacar que en ambos estudios se utilizaron dosis más altas que las que nosotros utilizamos, así como administraciones repetidas del siRNA. Por lo que, como futuras estrategias se podrían emplear polímeros como reactivo de transfección, hacer una curva dosis respuesta con cantidades más altas del siRNA y comprobar la disminución en la expresión de la proteína VAMP3 en las células del peritoneo. Estos estudios son necesarios para poder asegurar que VAMP3 no participa en la secreción de TNF en el modelo *in vivo* de endotoxemia por LPS.

*VAMP8 participa en la secreción de TNF estimulada por LPS en la línea celular RBL- 2H3 sometida a un protocolo de sensibilización con IgE e IFN- $\gamma$*

Diversos estudios han demostrado que VAMP8 controla la salida de ciertos mediadores, como histamina y  $\beta$ -hexosaminidasa, mientras que no parece tener relevancia en la liberación de citocinas como TNF (Tiwari et al., 2008 y Puri & Roche, 2008). Nosotros encontramos que VAMP8 colocaliza con TNF desde condiciones basales y que la asociación de estas dos proteínas aumenta significativamente cuando las células son estimuladas con el rLPS (figura 20b y 21). De manera interesante, se observó una redistribución de VAMP8 y TNF muy cerca del núcleo, en una estructura celular muy parecida a la conocida como nube perinuclear, donde se concentran las vesículas de la vía endo y exocítica (Jongsma et al., 2016) . Las vesículas asociadas con esta estructura presentan una limitada movilidad e incluye a los endosomas tempranos y tardíos, lisosomas y algunas vesículas de la red trans Golgi (Dellibovi-Raghelo & Althan-Bonnet, 2009). Se sabe que VAMP8 forma parte de los endosomas temprano y tardíos (Hong, 2005), lo cual podría ser una de las razones por las que observamos una acumulación de TNF/VAMP8 en la nube perinuclear aunado a que la estimulación con LPS induce un tráfico vesicular altamente dinámico. Esto nos habla de la gran regulación entre los sistemas endo y exocítico (Dellibovi-Raghelo & Althan-Bonnet, 2009).

Por otra parte, la disminución en un 70% de la expresión de VAMP8, abate la secreción de TNF, inclusive regresándola a niveles basales (Figura 24). Estos resultados nos hablan de la importante participación de VAMP8 en el proceso de secreción de TNF en nuestro modelo celular; y contrasta con los estudios hechos en BMMCs derivadas de animales *Knockout* para VAMP8 y estimuladas con IgE/Ag (Tiwari et al., 2008). Se sabe que la activación de las células cebadas por estos estímulos (IgE/Ag y LPS) conlleva a la liberación de mediadores por distintas vías de secreción (Blank et al., 2014); pero es importante señalar que el cambio de fenotipo de las RBL-2H3 parece ser que también está cambiando las proteínas involucradas en estas vías.

*VAMP3 se asocia a vesículas que contienen TNF en esa línea celular, pero su inhibición en un 50% con un siRNA específico, no tuvo efecto en la secreción de esta citocina*

Mediante técnicas de inmunofluorescencia se ha visto que TNF colocaliza de manera parcial con VAMP3 en BMMCs sin ningún estímulo (TNF preformado) y que VAMP3 es capaz de formar agregados muy cerca de la membrana plasmática en respuesta al LPS (Martín-Ávila et al., 2016). Nuestros resultados confirman que el TNF preformado colocaliza con VAMP3 y que es una colocalización parcial (figura 20a); sin embargo, cuando las células fueron estimuladas con rLPS no se observó ningún cambio en la redistribución de esta proteína hacia la membrana plasmática, contrastando con lo observado por Martín-Ávila y colaboradores.

A pesar de la clara colocalización entre TNF y VAMP3, no se observó una disminución en la secreción de TNF cuando las células fueron transfectadas con el siRNA de VAMP3 y posteriormente estimuladas con rLPS (figura 24). Estos resultados sugieren que, en células RBL-2H3 polarizadas hacia un fenotipo proinflamatorio, la proteína VAMP3 no participa de manera importante en la secreción de TNF y que probablemente este mediando otro tipo de secreción como la picemal o procesos de secreción basal, lo cual se ha observado en BMMCs deficientes de VAMP8 (Tiwari et al., 2009).



También se sabe que las proteínas VAMPs pueden tener efectos compensatorios, es decir, en ausencia de una VAMP, otra podría ejercer las funciones sin alterar, de manera importante, la exocitosis de un mediador. Tiwari y colaboradores en el 2009, observaron un aumento en la expresión de VAMP3 en células deficientes de VAMP8 y en una revisión por Wanjin Hong en el 2005, el autor menciona que VAMP3 y VAMP8 pueden tener un solapamiento de funciones ya que ambas están localizadas en los endosomas tempranos, y podrían estar compartiendo funciones en estas vías endocíticas. Además, se ha demostrado que ambas proteínas colocalizan con el receptor de transferrina (TfR) el cual es un marcador de endosomas tempranos (Galli et al., 1994; Wong et al., 1998).

En macrófagos activados por LPS es bien conocida la participación de VAMP3 en la secreción de TNF. Stow y colaboradores en el 2005 demostraron que el TNF pasa del complejo de Golgi a endosomas de reciclamiento que son positivos para VAMP3 y que es esta proteína la que lleva a la liberación de TNF hacia la copa fagocítica. Más aún, cuando sobreexpresaron a VAMP3 vieron un aumento significativo en la secreción de TNF y utilizando un siRNA para VAMP3 vieron una disminución del TNF en la copa fagocítica, sugiriendo la participación activa de esta SNARE. En nuestro modelo de células cebadas no observamos una participación tan relevante de VAMP3 en la secreción de TNF; esto pudiera deberse principalmente a que las células cebadas contienen TNF preformado y este podría secretarse por vías diferentes e involucrar otras proteínas SNAREs. En macrófagos se sabe que la secreción de citocinas, como el TNF, se lleva a cabo por vía constitutiva y que las proteínas SNAREs aumentan su expresión cuando la célula es activada por algún estímulo para aumentar también la secreción de mediadores (Murray et al., 2005; Stow & Murray, 2013).

### *La gran plasticidad de las células cebadas*

Finalmente, es importante señalar el protocolo de sensibilización utilizado para lograr que las células RBL-2H3 respondieran al LPS y fueran capaces de secretar TNF; ya que diversos estudios demostraron que no responden a este estímulo y por lo tanto no secretan TNF (Passante et al., 2009; Passante & Frankish, 2010). En nuestro laboratorio se probaron diferentes condiciones de cultivo celular y se encontró que la sensibilización con IgE e IFN- $\gamma$  aumenta los niveles de expresión de moléculas como CD14 y de MD-2, las cuales son importantes en la señalización del TLR-4. Con esta sensibilización se logró aumentar los niveles de secreción de TNF en respuesta al quimiotipo rugoso del LPS. Se ha demostrado que este quimiotipo activa al TLR-4 en ausencia de CD14 (Huber et al., 2006), lo cual potencia aún más la respuesta en las células RBL-2H3, que parecen no expresar a este co-receptor (Passante et al., 2009 SUPPL 1; Passante & Frankish, 2010). También se sabe que la sensibilización con IgE aumenta la secreción de TNF en respuesta al LPS en BMMCs (Medina-Tamayo et al., 2011). En el caso del IFN- $\gamma$  se sabe que en macrófagos polariza el fenotipo de éstos hacia un fenotipo M1 o proinflamatorio y que son capaces de responder mejor a estímulos como el LPS, secretando rápidamente citocinas proinflamatorias como TNF (Shapouri-Moghaddam et al., 2018) Creemos que en las células RBL-2H3, el IFN- $\gamma$  está haciendo lo mismo, y que puede ser una molécula capaz de cambiar el fenotipo de éstas para que respondan al estímulo y secreten TNF, lo cual se fundamenta por la gran plasticidad que tienen las células cebadas. Además, debido a la capacidad que tienen de liberar mediadores con efectos antiinflamatorios o proinflamatorios, la polarización de las células cebadas hacia un fenotipo predominante podría ayudar a combatir diversas enfermedades relacionadas con procesos de inflamación crónica.

## 9. CONCLUSIONES

VAMP8 participa en la secreción de TNF estimulada por LPS en células RBL-2H3 polarizadas hacia un fenotipo proinflamatorio.

VAMP3 se asocia con vesículas que contienen TNF pero no participa de manera importante en la secreción de esa citocina en respuesta al LPS.

Las proteínas que participan en la secreción de TNF en las células RBL-2H3 pueden ser modificadas por la adición de citocinas en el medio celular, tal y como ocurre con otros linajes celulares del sistema inmune.

## 10. PERSPECTIVAS

- Continuar estudiando el mecanismo detallado de la secreción de TNF en células RBL-2H3 estimuladas con rLPS y polarizadas hacia un fenotipo proinflamatorio.
- Analizar la participación de VAMP8 en la secreción de TNF *in vivo* utilizando el modelo de endotoxemia por LPS.
- Aumentar la dosis del siRNA de VAMP3 para lograr ver un efecto en la secreción de TNF *in vivo*.
- Comprobar los knockdown de VAMP3 y VAMP8 mediante Western blot en el modelo *in vivo* de endotoxemia por rLPS.
- Medir la secreción de otras citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , utilizando células RBL-2H3 transfectadas con el siRNA de VAMP8 y VAMP3.
- Estudiar la participación de algunas proteínas Rabs en el proceso de secreción de TNF.
- Utilizar marcadores asociados a la nube perinuclear, como RNF26 (RING finger protein 26), para comprobar la polarización de TNF/VAMP8 hacia esta estructura.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Avila, M., & Gonzalez-Espinosa, C. (2011). Signaling through Toll-like receptor 4 and mast cell-dependent innate immunity responses. *IUBMB Life* **63**, 922–929.
2. Avila, M., Martinez-Juarez, A., Ibarra-Sanchez, A., & Gonzalez-Espinosa, C. (2012). Lyn kinase controls TLR4-dependent IKK and MAPK activation modulating the activity of TRAF-6/TAK-1 protein complex in mast cells. *Innate Immunity* **18**, 648–660.
3. Beghdadi, W., Madjene, L. C., Benhamou, M., Charles, N., Gautier, G., Launay, P., & Blank, U. (2011). Mast cells as cellular sensors in inflammation and immunity. *Frontiers in Immunology* **2**, 1–15.
4. Blank, U., Madera-Salcedo, I. K., Danelli, L., Claver, J., Tiwari, N., Sánchez-Miranda, E., Vázquez-Victorio, G., Ramírez-Valadez, K.A., Macias-Silva, M., & González-Espinosa, C. (2014). Vesicular trafficking and signaling for cytokine and chemokine secretion in mast cells. *Frontiers in Immunology* **5**, 1-18.
5. Bolte, S. & Cordelieres, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy* **224**, 213-232.
6. Borna, H., Imani, S., Iman, M., & Azimzadeh, S. (2015). Therapeutic face of RNAi: *in vivo* challenges. *Expert Opinion on Biological Therapy* **15**, 269 -285.
7. Dellibovi-Raghelo, T., & Althan-Bonnet, N. (2009). Cloud Storage for Cloud. *The EMBO Journal* **35**, 1724–1725.
8. Dwyer, D. F., Barrett, N. A., Austen, K. F., & The Immunological Genome Project Consortium. (2016). Expression profiling of constitutive mast cells reveals a unique identity within the immune system. *Nature Immunology* **17**, 878–887.
9. Eastmond, N. C., Banks, E. M., & Coleman, J. W. (1997). Nitric oxide inhibits IgE-mediated degranulation of mast cells and is the principal intermediate in IFN-gamma-induced suppression of exocytosis. *The Journal of Immunology* **159**, 1444–1450.

10. Echtenacher, B., Mannel, D. N., & Hultner, L. (1996). Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* **381**, 75-77.
11. Eccleston, E., Leonard, B.J., Lowe, J.S & Welford H.J. (1973). Basophilic leukaemia in the albino rat and a demonstration of the basopoietin. *Nature New Biology* **244**, 73-76.
12. Falcone, F. H., Wan, D., Barwary, N., & Sagi-Eisenberg, R. (2018). RBL cells as models for in vitro studies of mast cells and basophils. *Immunological Reviews* **282**, 47–57.
13. Frossi, B., Mion, F., Sibilano, R., Danelli, L., & Pucillo, C. E. M. (2018). Is it time for a new classification of mast cells? What do we know about mast cell heterogeneity? *Immunological Reviews* **282**, 35–46.
14. Frossi, B., Mion, F., Tripodo, C., Colombo, M. P., & Pucillo, C. E. (2017). Rheostatic Functions of Mast Cells in the Control of Innate and Adaptive Immune Responses. *Trends in Immunology* **38**, 648–656.
15. Galli, T., Chilcote, T., Mundigl, O., Binz, T., Niemann, H., & De Camilli, P. (1994). Tetanus toxin-mediated cleavage of cellubrevin impairs exocytosis of transferrin receptor-containing vesicles in CHO cells. *Journal of Cell Biology* **125**, 1015-1024.
16. Galli, S. J., Kalesnikoff, J., Grimbaldston, M. A., Piliponsky, A. M., Williams, C. M. M., & Tsai, M. (2005). MAST CELLS AS “ TUNABLE ” EFFECTOR AND IMMUNOREGULATORY CELLS: Recent Advances. *Annual Review of Immunology* **23**, 749-786.
17. Gentek, R., Ghigo, C., Hoeffel, G., Bulle, M. J., Msallam, R., Gautier, G., Launay, P., Chen, L., Ginhoux F., & Bajénoff, M. (2018). Hemogenic Endothelial Fate Mapping Reveals Dual Developmental Origin of Mast Cells. *Immunity* **48**, 1160–1171.
18. Gon, Y., Nunomura, S., & Ra, C. (2005). Common and distinct signalling cascades in the production of tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-13 induced by lipopolysaccharide in RBL-2H3 cells. *Clinical and Experimental Allergy* **35**, 635-642.
19. Grimbaldston, M. A., Chen, C., Piliponsky, A. M., Tsai, M., Tam, S., & Galli, S. J. (2005). Mast Cell-Deficient *W-sash c-kit* Mutant *Kit*<sup>W-sh/W-sh</sup> Mice as a Model for Investigating Mast Cell Biology *in Vivo*. *Tissue Engineering* **167**, 835–848.

20. Guzmán-Mejía, F., López-Rubalcava, C., & González-Espinosa, C. (2018). Stimulation of nAChR $\alpha$ 7 Receptor Inhibits TNF Synthesis and Secretion in Response to LPS Treatment of Mast Cells by Targeting ERK1/2 and TACE Activation. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* **13**, 39-52.
21. Higuchi, Y., Kawakami, S., & Hashuda, M. (2010). Strategies for in vivo delivery of siRNAs: Recent progress. *BioDrugs* **24**, 195–205.
22. Hong, W. (2005). SNAREs and traffic. *Biochimica et Biophysica Acta* **1744**, 120–144.
23. Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S., Tsukamoto, H., & Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF-  $\alpha$ : structure , function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* **49**, 1215–1228.
24. Howard, K. A., Paludan, S. R., Behlke, M. A., Besenbacher, F., Deleuran, B., & Kjems, J. (2009). Chitosan/siRNA nanoparticle-mediated TN- $\alpha$  knockdown in peritoneal macrophages for anti-inflammatory treatment in a murine arthritis model. *Molecular Therapy* **17**, 162–168.
25. Huber, M., Kalis, C., Keck, S., Jiang, Z., Georgel, P., Du, X., Shamel, L., Sovath, S., Mudd, S., Beutler, B., Galanos, G., & Freudenberg, M. A. (2006). R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells. *European Journal of Immunology* **36**, 701–711.
26. Jena, B. P. (2007). Secretion machinery at the cell plasma membrane. *Current Opinion in Structural Biology* **17**, 437–443.
27. Jongsma, M.L.M., Berlin, I., Wijdeven, R.H.M., Janssen, L., Janssen, G.M.C., Garstka, M.A., Janssen, H., Mensink, M., van Veelen, P.A., Spaapen, R.M., & Neefjes, J. (2016). An ER-Associated Pathway Defines Endosomal Architecture for Controlled Cargo Transport. *Cell* **166**, 152–166.
28. Keck, S., Müller, I., Fejer, G., Savic, I., Tchaptchet, S., Nielsen, P. J., Galanos, C., Huber, M., & Freudenberg, M.A. (2011). Absence of TRIF signaling in lipopolysaccharide-stimulated murine mast cells. *The Journal of Immunology* **186**, 5478–5488.
29. Kulczycki, A. Jr., Isersky, C., Metzger, H. (1974). The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. I. Evidence for specific binding of IgE. *Journal of Experimental Medicine* **139**, 600-616.
30. Lacy, P., & Stow, J.L. (2011). Cytokine release from innate immune cells : association with diverse membrane trafficking pathways. *Blood* **118**, 9–19.

31. Lee, M., Nam, K., & Choi, K. (2016). iRhoms ; Its Functions and Essential Roles. *Biomolecules & Therapeutics* **24**, 109–114.
32. Lorentz, A., Baumann, A., Vitte, J., & Blank, U. (2012). The SNARE machinery in mast cell secretion. *Frontiers in Immunology* **3**, 1-17.
33. Lundequist, A., & Pejler, G. (2011). Biological implications of preformed mast cell mediators. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**, 965-975.
34. Madera-Salcedo, I. K., Cruz, S. L., & Gonzalez-Espinosa, C. (2013). Morphine Prevents Lipopolysaccharide-Induced TNF Secretion in Mast Cells Blocking I B Kinase Activation and SNAP-23 Phosphorylation: Correlation with the Formation of a  $\beta$ -Arrestin/TRAF6 Complex. *The Journal of Immunology* **191**, 3400–3409.
35. Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E., & Abraham, S. N. (1996). Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* **381**, 77–80.
36. Manders, E.M.M., Verbeek, F.J., & Aten, J.A. (1993). Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy* **169**, 375-382.
37. Marshall, J. S. (2004). Mast-cell responses to pathogens. *Nature Reviews Immunology* **4**, 787–799.
38. Martín-Ávila, A., Medina-Tamayo, J., Ibarra-Sánchez, A., Vázquez-Victorio, G., Castillo-Arellano, J. I., Hernández-Mondragón, A. C., Rivera, J., Madera-Salcedo, I.K., Blank, U., Macías-Silva, M., & González-Espinosa, C. (2016). Protein Tyrosine Kinase Fyn Regulates TLR4-Elicited Responses on Mast Cells Controlling the Function of a PP2A-PKC $\alpha$ / $\beta$  Signaling Node Leading to TNF Secretion. *The Journal of Immunology* **196**, 5075-5088.
39. Medina-Tamayo, J., Ibarra-Sánchez, A., Padilla-Trejo, A., & González-Espinosa, C. (2011). IgE-dependent sensitization increases responsiveness to LPS but not modify development of endotoxin tolerance in mast cells. *Inflammation Research* **60**, 19-27.
40. Moon, T. C., Dean Befus, A., & Kulka, M. (2014). Mast cell mediators: Their differential release and the secretory pathways involved. *Frontiers in Immunology* **5**, 1–18.
41. Murray D.B. (2013). Mast Cells: Phenotypic Features, Biological Functions and Role in Immunity. New York: Nova Biomedical.

42. Murray, R.Z., Kay, J.G., Sangemani, D.G., & Stow, J.L. (2005). A Role for the Phagosome in Cytokine Secretion. *Science* **310**, 1492-1495.
43. Naskar, P., & Puri, N. (2017). Phosphorylation of SNAP-23 regulates its dynamic membrane association during mast cell exocytosis. *Biology Open* **6**, 1257–1269.
44. Nickel, W., & Rabouille, C. (2009). Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 148–155.
45. Okumura, S., Kashiwakura, J., Tomita, H., Matsumoto, K., Nakajima, T., Saito, H., & Okayama, Y. (2003). Identification of specific gene expression profiles in human mast cells mediated by Toll-like receptor 4 and FcεRI. *Immunobiology* **102**, 2547–2554.
46. Passante, E., Ehrhardt, C., Sheridan, H., & Frankish, N. (2009). RBL-2H3 cells are an imprecise model for mast cell mediator release. *Inflammation Research* **58**, 611-618.
47. Passante, E., Ehrhardt, C., Sheridan, H., & Frankish, N. (2009). Toll-like receptors and RBL-2H3 mast cells. *Inflammation Research* **58** (SUPPL. 1), 11–12.
48. Passante, E., & Frankish, N. (2009). The RBL-2H3 cell line: Its provenance and suitability as a model for the mast cell. *Inflammation Research*, **58**, 737–745.
49. Passante, E., & Frankish, N. (2010). Deficiencies in elements involved in TLR4-receptor signalling in RBL-2H3 cells. *Inflammation Research* **59**, S185-S186.
50. Paumet, F., Le Mao, J., Martin, S., Galli, T., David, B., Blank, U., & Roa, M. (2000). Soluble NSF Attachment Protein Receptors (SNAREs) in RBL-2H3 Mast Cells: Functional Role of Syntaxin 4 in Exocytosis and Identification of a Vesicle-Associated Membrane Protein 8-Containing Secretory Compartment. *The Journal of Immunology* **164**, 5850–5857.
51. Płóciennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzęcka, K., & Kwiatkowska, K. (2015). Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* **72**, 557–581.
52. Puri, N., & Roche, P. A. (2008). Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 2580–5.



53. Ribatti D. & Crivellato E. (2011). Mast Cells and Tumours. Berlin: Springer. 3-50.
54. Saito, H., Matsumoto, K., Okumura, S., Kashiwakura, J., Oboki, K., Yokoi, H., Kambe, N., Ohta, K., & Okayama, Y. (2006). Gene expression profiling of human mast cell subtypes: an in silico study. *Allergology International : Official Journal of the Japanese Society of Allergology* **55**, 173–9.
55. Sandig, H., & Bulfone-Paus, S. (2012). TLR signaling in mast cells: Common and unique features. *Frontiers in Immunology* **3**, 1–13.
56. Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadian, A., Afshari, J.T., & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology* **233**, 6425–6440.
57. Sørensen, D. R., Leirdal, M., & Sioud, M. (2003). Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *Journal of Molecular Biology* **327**, 761–766.
58. St John, A. L., & Abraham, S. N. (2013). Innate immunity and its regulation by mast cells. *The Journal of Immunology* **190**, 4458-4463.
59. Stow, J.L., Ching Low, P., Offenhäuser, C., & Sangermani, D. (2009). Cytokine secretion in macrophages and other cells: Pathways and mediators. *Immunobiology* **214**, 601–612.
60. Stow, J.L., Manderson, A.P., & Murray, R.Z. (2006). *SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system*. *Nature Reviews Immunology* **6**, 919-929.
61. Stow, J.L. & Murray, R.Z. (2013). Intracellular trafficking and secretion of inflammatory cytokines. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **24**, 227-239.
62. Sun, Y., & Shang, D. (2015). Inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. *Mediators of Inflammation* **2015**, 1-8.
63. Tiwari, N., Wang, C., Brochetta, C., Ke, G., Vita, F., Qi, Z., Rivera, J., Soranzo, M.R., Zabucchi, G., Hong, W., & Blank, U. (2008). VAMP-8 segregates mast cell preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways. *Blood* **111**, 3665-3674.

64. Tiwari, N., Wang, C. C., Brochetta, C., Scanduzzi, L., Hong, W., & Blank, U. (2009). Increased formation of VAMP-3-containing SNARE complexes in mast cells from VAMP-8 deficient cells. *Inflammation Research* **58**, S13-S14.
65. Vaidyanathan, V.V., Puri, N., & Roche, P. A. (2001). The Last Exon of SNAP-23 Regulates Granule Exocytosis from Mast Cells. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 25101–25106.
66. Wernersson, S., & Pejler, G. (2014). Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nature Reviews Immunology* **14**, 478–94.
67. Wong, S.H., Zhang, T., Xu, Y., Subramaniam, V.N., Griffiths, G., & Hong, W. (1998). Endobrevin, a novel synaptobrevin/VAMP-like protein preferentially associated with the early endosome. *Molecular Biology of the Cell* **9**, 1549-1563.
68. Xu, H., Bin, N.-R., & Sugita, S. (2018). Diverse exocytic pathways for mast cell mediators. *Biochemical Society Transactions*, 1-13.
69. Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J. L., & Tong, L. (2000). Structural basis for signal transduction by the toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* **408**, 111–115.
- Zhang, X., Rebane, A.A., Ma, L., Li, F., Jiao, J., Qu, H., Pincet, F., Rothman, J.E. & Zhang, Y. (2016). Stability, folding dynamics, and long-range conformational transition of the synaptic t-SNARE complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, E8031–E8040.

## ANEXO I

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

#### Medio DMEM para cultivar las células RBL-2H3

DMEM (#catálogo: 31600-034, Gibco).....	5 g
Bicarbonato de sodio.....	0.75 g
Piruvato de sodio (Sigma).....	5 mL del stock
Aminoácidos no esenciales (Gibco).....	5 mL del stock
Penicilina/Estreptomina (Gibco).....	6 mL del stock
Antibiótico/Antimicótico (Gibco).....	5 mL del stock
Suero fetal bovino inactivo (Gibco).....	50 mL

Ajustar el pH a 7.4 y aforar a 500 mL con H<sub>2</sub>O miliQ, posteriormente filtrar con un unidad de filtración de 0.22 µm (#catálogo 441117, Corning).

Almacenar a 4 °C.

#### Buffer Tyrode´s-BSA

Cloruro de sodio (NaCl, Sigma).....	7.88 g
Cloruro de potasio (KCl, Sigma).....	0.372 g
Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> , Sigma).....	0.203 g
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> , Sigma).....	0.264 g
Glucosa (Sigma).....	1.009 g
Hepes 1M pH 7.0 (Sigma).....	20 mL
Albúmina sérica bovina fracción V (Sigma).....	0.5 g

Ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1 L con H<sub>2</sub>O miliQ, posteriormente filtrar en unidad de filtración de 0.22 µm y almacenar a 4 °C.

\*Para preparar el **buffer Tyrode´s sin albúmina** se siguió el mismo procedimiento pero sin agregar los 0.5 g de albúmina sérica bovina fracción V.

### **Tripsina / EDTA al 0.05%**

Tripsina al 25% (Gibco)..... 10 mL

EDTA (Sigma)..... 0.25 g

Aforar a 500 mL con H<sub>2</sub>O miliQ y filtrar en unidad de filtración de 0.22 µm.  
Almacenar a 4°C.

### **Buffer Laemmli 1X**

Ortovanadato 200 mM..... 20 µL

β-mercaptoetanol (Sigma)..... 20 µL

Laemmli 2X (Sigma)..... 480 µL

Aforar a 1 mL con H<sub>2</sub>O miliQ (480 µL), vortexear unos segundos y utilizar el mismo día de su preparación.

### **PBS 1X**

Disolver 2 tabletas de PBS (Sigma) en 400 mL de H<sub>2</sub>O miliQ. Esterilizar en autoclave.

### **Wash Buffer**

A 1 L de PBS 1X agregar 500 µL de Tween-20 (Sigma). Almacenar a 4°C.

### **Buffer de corrida 10X**

Trizma® Base (Sigma)..... 30 g

Glicina (Sigma)..... 144 g

Dodecil Sulfato de sodio (SDS, Sigma)..... 10 g

Ajustar pH a 8.3, aforar a 1 L y almacenar a temperatura ambiente. Para preparar el buffer de corrida 1X (el utilizado para la electroforesis), disolver 100 mL de buffer de corrida 10X en 900 mL de H<sub>2</sub>O miliQ.

**Buffer de transferencia**

Trizma® Base.....	3.79 g
Glicina.....	18 g
Metanol.....	250 mL

Aforar a 1 L con H<sub>2</sub>O miliQ y almacenar a 4°C.

**TBS 10 X**

Trizma® Base.....	60 g
NaCl.....	90 g

Ajustar el pH a 7.5, aforar a 1 L con H<sub>2</sub>O miliQ y almacenar a temperatura ambiente.

**TBS-T 1X**

Disolver 100 mL de la solución TBS 10X en 900 mL de H<sub>2</sub>O miliQ y agregar 1 mL de Tween-20. Almacenar a temperatura ambiente.

**PFA al 4%**

Disolver 2 g de PFA en 50 mL de PBS 1X. Ajustar el pH a 7.4, filtrar y usar inmediatamente.