



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE MORELOS**

**FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARÍA DE DOCENCIA
JEFATURA DEPOSGRADO**

**INFLUENCIA DE LA PROTEÍNA ADAPTADORA EAT-2 EN LA
SECRECIÓN DE CITOCINAS INFLAMATORIAS EN UN
MODELO DE MACRÓFAGOS HUMANOS**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN MEDICINA MOLECULAR**

**QUE PRESENTA
IBT. MAGDA KARINA ESPÍNDOLA MARTÍNEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ**

CUERNAVACA MORELOS, MÉXICO JULIO, 2020

Pues, desde la creación del mundo, todos han visto los cielos y la tierra. Por medio de todo lo que Dios hizo, ellos pueden ver a simple vista las cualidades invisibles de Dios: su poder eterno y su naturaleza divina...

Romanos 1:20a NTV

AGRADECIMIENTOS

A Dios, todo lo que tengo viene de ti y es para dar toda la gloria a ti.

A mi Amore, eres mi motivo e inspiración cada mañana gracias por abrazar y hacer tuyo cada uno de mis sueños, te amo.

A mi papá, Pá te amo mucho. Gracias por todo lo que me has enseñado, por ser valiente y esforzado en cuidarnos y darnos lo mejor.

A Susi y Rosi, Dios se llevó a mamá para mostrarme su amor a través de dos hermosas mujeres que me alientan, me guían y han cuidado de mí desde siempre.

A Suris, gracias por ser nuestro amigo eres la respuesta a muchas oraciones, te quiero mucho.

A Emiliano, Marian, Jimena y Vale por hacerme ver que la vida no es tan complicada como parece, los quiero con todo el corazón.

Al Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz por recibirme con puertas abiertas, por su dirección y confianza durante la realización de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial:

Dra. Judith González Christen

Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl

Dra. Rosana Sánchez López

Dr. Jesús Santa Olalla Tapia

Por sus enseñanzas e invaluable aportaciones en cada tutorial y a lo largo de todo el proyecto.

A la Dra. Angélica Santana y Dr. Luis Cañedo por sus revisiones y aportaciones al trabajo escrito.

A Vicky, Dios me regaló una amiga en empaque oaxaqueño, te quiero mucho.

A mis amigos Arturo y Mali, gracias por mostrarme su apoyo incondicional desde el primer día, hicieron que día a día el laboratorio se sintiera como un hogar.

A Jonathan, Lucero y Jacqueline por su apoyo invaluable apoyo técnico y profesional.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP-1	Proteína activadora 1 Activator protein 1
ARN	Ácido ribonucleico
ASC	Proteína como partícula que contiene CARD asociada a apoptosis Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATP	Adenosín trifosfato
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BIR	Inhibidor de baculovirus de repeticiones de proteínas de apoptosis Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeats
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas Caspase recruitment domain
CD	Cúmulo de diferenciación Cluster of differentiation
CR1	Receptor de complemento tipo 1 Complement receptor type 1
CR3	Receptor de complemento tipo 3 Complement receptor type 3
CR4	Receptor de complemento tipo 4 Complement receptor type 4
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño Damage-associated molecular pattern
EAT-2	Transcrito asociado al sarcoma de Ewing 1 Ewing sarcoma-associated transcript
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ERT	Transductor relacionado a EAT-2 EAT-2 related transducer
FcR	Receptores para fragmentos Fc Fc receptor
FcγRI	Receptores para Fc gamma I Fc receptor I
FcγRII	Receptores para Fc gamma II Fc receptor II
FcγRIII	Receptores para Fc gamma III Fc receptor III
GFP	Proteína verde fluorescente Green fluorescent protein
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos

GRIP	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GRE	Golgin-97, RanBP2alpha, Imh1p and p230/golgin-245
	Elementos de respuesta a glucocorticoides
	Glucocorticoid response element
HSP	Proteína de choque térmico 60/65 (Heat Shock Proteins)
IFN- γ	Interferón gamma
I κ B	Inhibidor de NF- κ B NF- κ B inhibitor
IKK	Cinasa I κ B I κ B kinase
IKK α	Proteína cinasa I κ B alfa I κ B kinase alpha
IKK β	Cinasa I κ B beta I κ B kinase beta
IKK γ	Cinasa I κ B gamma I κ B kinase gamma
IKK ϵ	Cinasa I κ B épsilon I κ B kinase épsilon
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-18	Interleucina-18
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-1ra	Receptor antagonista de IL-1 Interleukin-1 receptor antagonist
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible Inducible nitric oxide synthase
IRAK-1	Proteína cinasa 1 asociada al receptor de IL-1 IL-1R-associated kinase 1
IRAK-4	Proteína cinasa 4 asociada al receptor de IL-1 IL-1R-associated kinase 4
IRF	Factor regulador del interferón Interferon regulatory factor
ITAM	Motivo activador de inmunoreceptor basado en tirosinas Immunoreceptor Tyrosine-based activation motif
ITSM	Motivo interruptor de inmunoreceptor basado en tirosinas Immunoreceptor tyrosine-based switch motif
KO	Mutaciones nulas Knockout
LPS	Lipopolisacárido

MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógeno Mitogen-activated protein kinases
MARCO	Receptor de macrófagos con estructura colágenos Macrophage receptor with collagenous structure
MCH	Complejo mayor de histocompatibilidad Major histocompatibility complex
M-CSF	Factor estimulante de colonias de monocitos Macrophage Colony Stimulating Factor
MVBs	Cuerpos multivesiculares Multivesicular Bodies
MyD88	Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 Myeloid differentiation primary response 88
NACHT	Dominio de oligomerización y unión a nucleotido Nucleotide binding and oligomerization domain
NADPH	Nicotin adenin fosfato dinucleótido Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NEMO	Modulador esencial de NF-κB NF-κB essential modulator
NF-κB	Factor nuclear kappa B Nuclear factor-kappa B
NKC	Células asesinas naturales Natural killer cells
NK-T	Células T asesinas naturales T cells killer natural
NLRP	NLRs con regiones PYD NOD-like receptor Pyrin domain containing
NLRs	Receptores tipo NOD NOD-like receptors
NO	Óxido nítrico Nitric oxide
NOX2	NADPH oxidasa 2 NADPH Oxidase 2
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos Pathogen-associated molecular patterns
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica Pheripheral blood mononuclear cells
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa Polymerase chain reaction
PLC-γ	Fosfolipasa C gamma Phospholipase C gamma
PMA	Forbol-12-Miristato-13-Acetato
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones Pattern recognition

PYD	Dominio de unión a pirina Pyrin domain
Q-SNARE	Receptores de SNAP que contienen glutamina Q-Soluble NSF Attachment Protein Receptor
R-SNARE	Receptores de SNAP que contienen arginina R-Soluble NSF Attachment Protein Receptor
SAP	Proteína adaptadora asociada a los receptores SLAM SLAM-associated protein
SH2	Dominio con homología a Src 2 Src homology 2 domain
SHIP-1	Polifosfatasa de inositol 1 con dominios SH2 SH2 containing inositol 5'-polyphosphatase
SHP-1	Fosfatasa 1 con dominios SH2 SH2 domain-containing phosphatase 1
SHP-2	Fosfatasa 2 con dominios SH2 SH2 domain-containing phosphatase 2
SNAP	Proteína soluble de fijación a NSF Soluble NSF Attachment Protein
STX4	Sintaxina 4
STX6	Sintaxina 6
STX7	Sintaxina 7
SLAM	Moléculas activadoras de señalización de linfocitos Signalling lymphocytic activation molecule
SRA-1	Receptor de esteroides ARN activador 1 Steroid receptor RNA activator protein
TAB	Proteínas de unión a TAK1 TAK1-binding protein
TACE	Enzima metaloproteasa convertidora de TNF- α TNF- α converting enzyme
TAK1	Cinasa-1 activadora del factor de crecimiento tumoral β Transforming growth factor beta-activated kinase 1
TBK-1	Proteína cinasa de unión a TANK TANK binding kinase 1
TIM	Receptor de dominio de mucina de inmunoglobulina de células T T cell immunoglobulin mucin domain
TIR	Toll/receptor de IL-1 Toll/IL-1R
TLRs	Receptores tipo Toll Toll-like receptors
TNF- α	Factor de necrosis tumoral Tumor necrosis factor
TRAF3	Factor-3 asociado al receptor de TNF Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3
TRAF6	Factor-6 asociado al receptor de TNF

TRAM	Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 Molécula adaptadora relacionada a TRIF TRIF-related adaptor molecule
TRIF	Proteína adaptadora de dominio TIR que induce interferón beta TIR domain containing adaptor protein inducing IFN- β
VAMP3	Proteína 3 de membrana asociada a vesículas Vesicle Associated Membrane Protein 3
VEB	Virus de Epstein-Barr
XIAP	Inhibidor de apoptosis ligado al cromosoma X X-linked inhibitor of apoptosis
XLP	Síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X X-linked lymphoproliferative syndrome

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Vía de secreción de citocinas	15
Figura 2.	Vía de señalización de TLRs y sus ligandos	19
Figura 3.	Estructura y expresión de las proteínas adaptadoras de la familia SAP	24
Figura 4.	Mecanismo de señalización de las proteínas adaptadoras de la familia SAP	26
Figura 5.	Expresión de CD14 en células THP-1 tratadas con PMA	36
Figura 6.	Expresión de las proteínas EAT-2 WT y EAT-2 Y127F en células THP-1	38
Figura 7.	Expresión de las proteínas EAT-2 WT y EAT-2 Y127F en monocitos THP-1, MΦ y MΦ estimulados con <i>M. bovis</i>	39
Figura 8.	Producción de TNF-α en MΦ THP-1 parentales provenientes de dos grupos de trabajo	41
Figura 9.	Producción de TNF-α en MΦ THP-1 que expresan EAT-2 WT y EAT-2 Y127F	42
Figura 10.	Producción de IL-6 en MΦ THP-1 que expresan EAT-2 WT y EAT-2 Y127F	44
Figura 11.	Producción de IL-1β en MΦ THP-1 que expresan EAT-2 WT y EAT-2 Y127F	45

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 El macrófago y su origen	12
1.2 Funciones efectoras del macrófago.....	14
1.2.1 Fagocitosis.....	14
1.2.2 Secreción de citocinas	15
1.3 Respuesta del macrófago a la fagocitosis de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	19
1.3.1 Receptores tipo Toll	20
1.3.2 Receptores tipo NOD	23
1.3.3 Dectina-1	24
1.4 Proteínas adaptadoras de la familia SAP, características estructurales.	25
1.5 Mecanismo de señalización de proteínas adaptadoras SAP	27
1.6 Función de las proteínas adaptadoras de la familia SAP	30
2. ANTECEDENTES.....	31
2.2 EAT-2 y su papel en la secreción de citocinas	31
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPÓTESIS.....	34
5. OBJETIVO GENERAL	34
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
7. METODOLOGÍA	35
7.1 Cultivo celular.....	35
7.2. Caracterización de las líneas celulares THP-1 pFB, THP-1 hEAT-2 WT y THP-1 hEAT-2 Y127F.....	35
7.3 Evaluación de la producción de TNF- α , IL-6 e IL-1 β en macrófagos THP-1 en respuesta a un estímulo con BCG.....	36
7.4 Análisis estadístico	37
8. RESULTADOS.....	38
8.1 Evaluación de la eficiencia de diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos.....	38
8.2 Expresión de la proteína adaptadora EAT-2 WT y EAT-2 Y127F en la línea celular THP-1.	39
8.3 Estandarización del ensayo para la producción de citocinas proinflamatorias en macrófagos THP-1.....	42
.....	43

8.4 Evaluación del papel de EAT-2 en la producción de TNF- α , IL-6 e IL-1 β por macrófagos THP-1 estimulados con <i>Mycobacterium bovis</i>	44
9. DISCUSIÓN	48
10. CONCLUSIONES.....	52
11. PERSPECTIVAS	52
12. REFERENCIAS	53

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El macrófago y su origen

Los macrófagos junto a los monocitos, los neutrófilos y las células dendríticas, pertenecen al sistema fagocítico mononuclear^{1,2}. Estos, tiene un rol clave en la respuesta inmune innata y adaptativa gracias a su alta plasticidad funcional, la cual se encuentra regulada al detectar cambios en las señales de su microambiente. Tal característica le permite al macrófago cumplir una función durante el proceso de inflamación y defensa del hospedero, así como en la remodelación de tejidos². Una de sus principales funciones es la remoción de agentes patógenos, partículas extrañas, células dañadas o muertas e incluso restos celulares. Todo lo anterior con el fin de mantener la homeostasis del organismo; de ahí que su distribución abarca distintos órganos y tejidos dando como resultado a subpoblaciones específicas residentes de tejido como las células de Kupffer en el hígado, los macrófagos alveolares en los pulmones, los osteoclastos presentes en el tejido del hueso, la microglía en el cerebro, las células dendríticas la epidermis y macrófagos presentes en el bazo y los ganglios linfáticos¹⁻³.

En ratones, los macrófagos se pueden originar de dos maneras, por un lado, los macrófagos residentes de tejido como las células dendríticas y la microglía, son las primeras células hematopoyéticas en aparecer durante el desarrollo embrionario a partir del saco vitelino desde el día 9 y 10 de gestación, incluso antes de que los monocitos sean detectados en sangre. Lo anterior sugiere que su origen es independiente de los precursores de la medula ósea⁴. Además, se ha observado que éstos tienen el potencial de proliferar de manera local durante condiciones de inflamación o daño con el fin de mantener el número de macrófagos residentes disponibles para contender con el microorganismo⁴. Sin embargo, en la etapa de adulto la mayoría de los macrófagos se derivan de los monocitos que se generan a partir del precursor mieloide común ubicado en la medula ósea. En este ambiente su proliferación y maduración son mediados por citocinas como el factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF, del inglés Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor), adicionalmente el factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF, del inglés Macrophage Colony Stimulating Factor) ayuda a la maduración del precursor monoblastos y promonocitos, los cuales son capaces de abandonar la medula ósea y circular en la sangre hasta que un estímulo inflamatorio los lleve a ser reclutados hacia los tejidos para su diferenciación a macrófagos o células dendríticas^{2,3,5}.

Como se mencionó anteriormente, los macrófagos tienen una gran plasticidad funcional en respuesta a las señales que perciben del ambiente. Esto los lleva a sufrir una diferenciación hacia distintos estados de activación. Por un lado, los macrófagos que son estimulados por ligandos de receptores tipo Toll (TLRs, del inglés Toll-like receptors) y citocinas como interferón gamma (IFN- γ) sufren una “activación clásica” y se hace referencia de ellos como macrófagos M1. Estos macrófagos tipo M1 presentan una elevada producción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- α , del inglés tumor necrosis factor), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8), incrementan la expresión de TLR2 y TLR4, así como de los receptores para fragmentos Fc (FcR, del inglés Fc receptor) tipo I,II y III, además de aumentar su capacidad para presentar antígenos como resultado de un aumento en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MCH, del inglés Major histocompatibility complex) clase II y el cúmulo de diferenciación (CD, del inglés Cluster of differentiation) CD86. Todo esto también se acompaña de un incremento en la producción de intermediarios tóxicos como especies reactivas de oxígeno (EROs) y óxido nítrico (NO, del inglés Nitric oxide), los cuales son responsables de la actividad bactericida^{3,6-8}. A diferencia de los macrófagos M1, los macrófagos M2 son producto de un programa de activación distinto conocido como “activación alternativa”. Ésta resulta de la activación del macrófago por diferentes vías, una es mediada por inmunocomplejos y citocinas como interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13), y su consecuencia es el desarrollo de un fenotipo que les permite modular la respuesta inflamatoria y la reparación de tejido, ambos dependientes de la producción de la citocina anti inflamatoria interleucina-10 (IL-10) y del receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra, del inglés interleukin-1 receptor antagonist). De igual forma, su capacidad de eliminar los desechos del microambiente se ve favorecida por el aumento en la expresión de los receptores scavenger A y B⁶. Pese a ello, se cree que entre un fenotipo y otro existen múltiples estados de activación que hacen de los macrófagos células funcionalmente variables y especializadas en desempeñar correctamente su función. A continuación, se dará una breve introducción a las principales funciones del macrófago que nos ayudará a entender el papel e importancia de estas células en el sistema inmune.

1.2 Funciones efectoras del macrófago

1.2.1 Fagocitosis

El principal mecanismo por el cual los macrófagos se encargan de la eliminación de microorganismos, partículas extrañas y células muertas es por la fagocitosis. Este proceso de defensa consiste en activar endocitosis envolviendo las partículas en vesículas mayores a 0.5 μm de diámetro, dentro de lo que se denominan vesículas fagocíticas que a su vez se fusionarán a los lisosomas para formar un compartimento llamado fagolisosoma en donde ocurre la destrucción de la partícula. Para que la fagocitosis se lleve a cabo se requiere del reconocimiento del microorganismo o la partícula a fagocitar, es decir, una interacción ligando-receptor, lo cual no debe confundirse con la endocitosis mediada por receptor la cual se lleva a cabo en todas las células de mamífero con fines como el suministro de nutrientes o la regulación del entorno extracelular, mientras que la fagocitosis es un proceso realizado por un número limitado de células principalmente aquellas involucradas en la defensa del huésped. Tal reconocimiento del microorganismo puede ser directo o a través de intermediarios como las opsoninas⁹. De acuerdo a las moléculas (ligandos) que reconocen estos receptores, se han clasificado como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés Pattern recognition receptor) como, por ejemplo, el receptor de manosa CD206, el receptor de macrófagos con estructura colagenosa (MARCO, del inglés Macrophage receptor with collagenous structure), el receptor de esteroides ARN activador 1 (SRA-1, del inglés Steroid receptor RNA activator protein) y Dectina-1 los cuales reconocen directamente patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés Pathogen-associated molecular patterns) en la superficie de los microorganismos. Otra categoría de receptores incluye al receptor para fragmentos Fc gamma I (Fc γ RI, del inglés Fc-gamma receptor I), el receptor para Fc gamma II isoformas A/C (Fc γ R2, del inglés Fc-gamma receptor II) y el receptor para Fc gamma III (Fc γ R3, del inglés Fc-gamma receptor III) que se unen a la porción Fc de los anticuerpos y el receptor de complemento tipo 1 (CR1, del inglés Complement receptor type 1), el receptor de complemento tipo 3 (CR3, del inglés Complement receptor type 3) y el receptor de complemento tipo 4 (CR4, del inglés Complement receptor type 4). También se añade a la clasificación aquellos que reconocen células apoptóticas como el receptor de dominio de mucina de inmunoglobulina de células T (TIM-1, del inglés T cell immunoglobulin mucin domain) 1 y el receptor TIM-4 que se unen a la fosfatidilserina presente en la superficie de células en proceso de apoptosis¹⁰. Una vez que ocurre el reconocimiento del microorganismo o partícula a través del receptor, la membrana

plasmática del macrófago sufre una redistribución que se extiende alrededor de la partícula formando una copa hasta envolverla completamente y cerrarse; esto da como resultado una vesícula intracelular llamada endosoma.

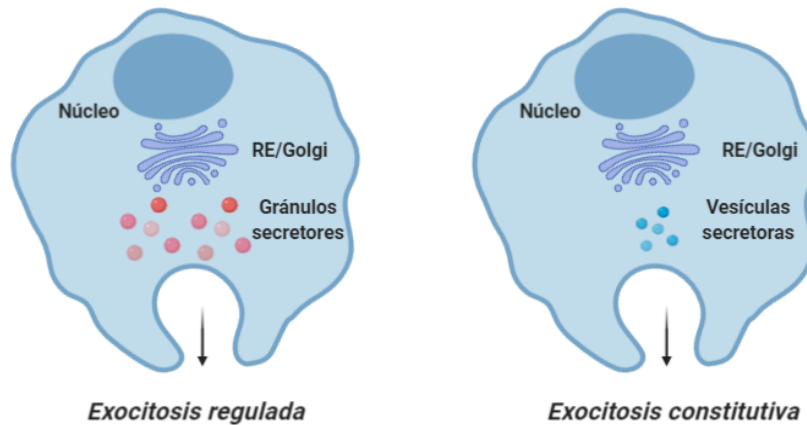
Los fagosomas así formados, sufren un proceso de maduración hasta fusionarse con los lisosomas para formar los fagolisosomas. En este compartimento celular se encuentra la enzima NADPH oxidasa 2 (NOX2, del inglés NADPH Oxidase 2), que es encargada de transferir electrones desde el nicotin adenin fosfato dinucleótido (NADPH, del inglés Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) al oxígeno molecular para la producción del anión superóxido (O_2^-). El anión superóxido puede ser convertido en H_2O_2 y posteriormente en ácido hipocloroso, el cual oxida la metionina y la tirosina de proteínas del microbio para inducir su muerte⁹. Además de la formación de EROs, en los fagolisosomas se producen especies reactivas de nitrógeno (ERNs) como el NO a partir de la oxidación de L-arginina por la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, del inglés Inducible nitric oxide synthase). Cabe mencionar que los macrófagos no expresan de manera constitutiva esta enzima a menos que sean activados a través de TLRs o IFN- γ . Aunque por si solo el NO es un radical toxico, este puede unirse a la vez con el ion superóxido para formar peroxinitrito que oxida ácidos nucleicos e induce la ruptura de la doble cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN)¹¹. Los macrófagos también expresan una gran variedad de péptidos antimicrobianos que actúan dañando la integridad de la membrana, proteínas y carbohidratos de los microorganismos ingeridos. Un ejemplo de ellos son las defensinas y los péptidos catiónicos antimicrobianos que se unen a través de interacciones electrostáticas a la superficie de la bacteria y forman poros en la membrana permitiendo el paso de iones creando un desbalance osmótico⁹.

1.2.2 Secreción de citocinas

Además de la fagocitosis, los macrófagos activados secretan citocinas proinflamatorias y quimiocinas como parte de su función de defensa creando un puente entre la inmunidad innata y adaptativa. Como se mencionó anteriormente, de acuerdo a su estado de activación, los macrófagos difieren en las citocinas que secretan y consecuentemente en su función. Ante un estímulo inflamatorio inducido por el reconocimiento de PAMPs y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, del inglés Damage-associated molecular pattern), los macrófagos sintetizan grandes cantidades de las citocinas proinflamatorias, principalmente TNF- α , IL-6, interleucina-1 beta (IL-1 β)¹². Aunque no son la únicas citocinas proinflamatorias secretadas por el macrófago,

éstas tienen la capacidad de modular la respuesta inflamatoria de manera local y sistémica al inducir la expresión de otras citocinas y quimiocinas permitiendo el reclutamiento de neutrófilos, monocitos y linfocitos al sitio de inflamación. Por ejemplo, TNF- α es una de las primeras citocinas en ser liberadas por el macrófago, se ha demostrado que una vez que el macrófago se estimula con lipopolisacárido (LPS), proTNF- α puede encontrarse en el aparato de Golgi en los próximos 20 minutos¹⁴. TNF- α es un mediador proinflamatorio que induce la expresión de citocinas, moléculas de adhesión y estimula el crecimiento celular, ésta citocina es una de las responsables del choque séptico además de ser un pirógeno y suprimir el apetito. En el hígado estimula la respuesta inflamatoria ya que aumenta la síntesis de proteína C reactiva, además induce vasodilatación que propicia la infiltración de linfocitos, neutrófilos y monocitos al sitio dañado^{12,83}. Por su parte, IL-6 es una citocina proinflamatoria que al igual que TNF- α induce fiebre y promueve la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado, además de que regula procesos como la diferenciación de células B a células plasmáticas y la activación de células T citotóxicas¹². IL-1 β también estimula la producción de proteínas de fase aguda, induce fiebre y a nivel de sistema nervioso central promueve la secreción de prostaglandinas^{12,16}. En tanto que estas citocinas comparten varias funciones no es así con sus mecanismos de secreción. Actualmente la secreción de proteínas en general puede seguir dos vías de tráfico vesicular denominadas como la vía clásica o convencional y la vía no convencional las cuales se describirán a continuación (figura 1).

Vía de secreción convencional



Vía de secreción no convencional

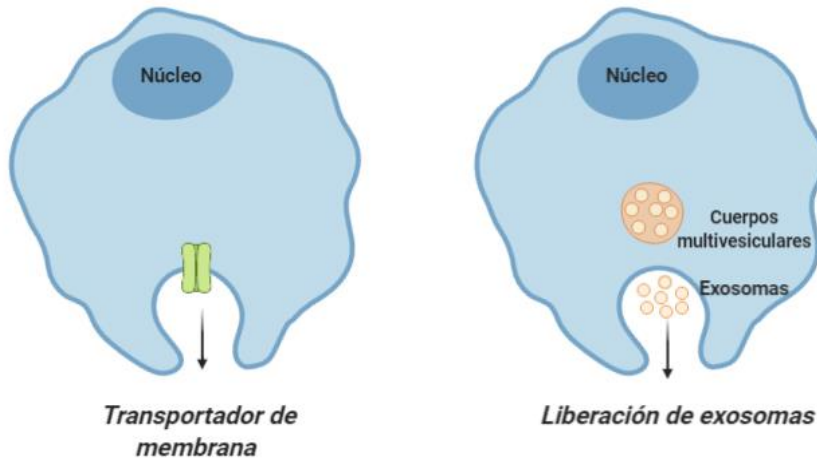


Figura 1. Vía de secreción de citocinas.

En la vía convencional las proteínas sintetizadas y procesadas en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi son transportadas hacia la membrana plasmática en vesículas recubiertas de membrana o gránulos para ser liberadas. Aunque las NKC y los macrófagos secretan por la vía convencional sus citocinas las NKC liberan citocinas formadas anticipadamente y almacenadas mientras que los macrófagos después de ser activados inician el proceso de síntesis y posterior liberación. En la vía no convencional, las proteínas sintetizadas en el citoplasma se secretan directamente desde ese punto a través de distintos mecanismos propuestos como transportadores de membrana y liberación de exosomas.

La vía convencional de transporte es utilizada por proteínas que presentan un péptido señal en el extremo N-terminal que le permite trasladarse al retículo endoplásmico para ser modificadas conforme van siendo sintetizadas. Posteriormente, las proteínas son transportadas en vesículas hacia el aparato de Golgi para su procesamiento y continúan a través de la red trans-Golgi para ser cargadas en vesículas o gránulos y ser liberadas hacia la membrana celular, tal vía de transporte es

utilizada por citocinas como TNF- α e IL-6^{12,13}. TNF- α es sintetizada como una proteína de membrana tipo II de 233 aminoácidos (26 kDa)⁸⁴. Una vez sintetizada se monta como homotrímero que es empacado en la red trans-golgi en vesículas asociadas a la proteína p230, un golgina con un dominio GRIP (del inglés Golgin-97, RanBP2alpha, Imh1p and p230/golgin-245) en su carboxilo terminal que permite el tráfico a través de la red trans-Golgi⁸⁵. A partir de la red trans-Golgi se libera en vesículas que contienen el complejo de receptores de SNAP que contienen glutamina (Q-SNARE, del inglés Q-Soluble NSF Attachment Protein Receptor) sintaxina 6 (STX6) – sintaxina 7 (STX7) -Vti1b necesario para la fusión con un compartimento intermedio que tiene naturaleza de endosoma de reciclaje a través de la interacción el receptor de SNAP que contienen arginina (R-SNARE, del inglés Q-Soluble NSF Attachment Protein Receptor) la proteína 3 de membrana asociada a vesículas (VAMP3, del inglés Vesicle Associated Membrane Protein 3)⁸⁶. Una vez cargado el endosoma de reciclaje, éste se fusiona a la membrana plasmática en el caso de específicamente en las copas fagocíticas para formar el complejo trans-SNARE con las proteínas Q-SNARE sintaxina 4 (STX4)- proteína soluble de fijación a NSF (SNAP, del inglés Soluble NSF Attachment Protein) 23 presentes en la membrana celular¹⁴. A partir de que se encuentra anclada a la membrana su ectodominio es liberado a través de un corte proteolítico por la enzima metaloproteasa convertidora de TNF- α (TACE, del inglés TNF- α converting enzyme) entre los residuos A⁷⁶ y V⁷⁷ obteniendo como resultado TNF- α soluble de 157 aminoácidos (17kDa) que es liberada al medio y es capaz de mediar diversas funciones a través de la unión a receptores de TNF tipo I y II⁸⁴. Es importante mencionar que con respecto al tráfico post-Golgi tanto TNF- α e IL-6 comparten el mismo endosoma de reciclaje que se fusionará a la membrana plasmática y por lo tanto la misma maquinaria de tráfico¹⁴. Cabe decir que dentro de la vía convencional la secreción puede ser regulada o constitutiva, un ejemplo de la secreción regulada se observa en las células asesinas naturales (NKC, del inglés Natural Killer Cells) las cuales tienen la capacidad de almacenar IFN- γ y perforina en gránulos secretores lo que permite que orquesten una liberación inmediata a los pocos minutos de encontrarse con su célula blanco, por otro lado la mayoría de las células inmunes secretan citocinas de manera constitutiva, tal es el caso de TNF- α e IL-6 en el macrófago que una vez activado da inicio a la síntesis de ambas citocinas y las secreta de manera continua según sea la intensidad y duración del estímulo.

No obstante, citocinas como IL-1 β son secretadas al medio a través de la vía no convencional, que es independiente del tráfico en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. En macrófagos activados IL-1 β se sintetiza como una molécula biológicamente inactiva que se acumula en el citosol. La pro forma de IL-1 β sufre un corte catalítico por la caspasa-1 generando la forma madura que será secretada sin pasar por el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi, cabe mencionar la activación de la caspasa-1 requiere el ensamblaje y activación del inflammasoma por lo que se requiere de un segundo estímulo para que el procesamiento de IL-1 β sea eficiente^{15,87}. Aunque aún no es claro el mecanismo por el cual se secreta IL-1 β se cree que esto puede deberse a múltiples mecanismos como liberación de lisosomas secretores, exocitosis de exosomas formados a partir de cuerpos multivesiculares (MVBs, del inglés Multivesicular Bodies) o a través de transportadores de membrana dependientes de adenosín trifosfato (ATP, del inglés Adenosine triphosphate) (figura 1)^{14,82,88}.

1.3 Respuesta del macrófago a la fagocitosis de *Mycobacterium tuberculosis*

Si bien la mayoría de los trabajos que estudian los eventos de síntesis y secreción de citocinas inflamatorias en macrófagos utilizan LPS como molécula estimuladora de TLR4/TLR2, otros estudios retan a las células con microorganismos completos como *Escherichia coli* o *Mycobacterium tuberculosis*, los cuales presentan una gran variedad de moléculas en su superficie capaces de unirse a diversos receptores celulares. Lo anterior desencadena una red de señales más complejas pero que se asemeja un poco más al proceso fisiológico. En humanos, *Mycobacterium tuberculosis* es el agente causal de la tuberculosis e infecta principalmente a los macrófagos presentes en los pulmones. Su modo de transmisión es esencialmente por partículas infectantes suspendidas en el aire, una vez inhalado llega hasta los alveolos donde la micobacteria se encuentra con los macrófagos alveolares, los cuales son la primera línea de defensa del hospedero y por lo tanto son células de gran importancia para la eliminación del bacilo⁶⁴. Después de este encuentro, el macrófago fagocita al bacilo con dos objetivos principales, el primero es su destrucción gracias a la producción de EROs, ERNs, formación del fagolisosoma y autofagia y el segundo es la activación del sistema inmune adaptativo gracias a la presentación de componentes de la micobacteria en el contexto de moléculas de MHC clase I y II^{65,66}. Sin embargo, además de la fagocitosis otros PRRs presentes en el macrófago como TLRs, receptores tipo NOD (NLRs, del inglés NOD-like receptors) y Dectina-1 llevan a la producción de citocinas proinflamatorias y de ellos se hablará con detalle a continuación.

1.3.1 Receptores tipo Toll

Los TLRs son una familia de proteínas de membrana tipo I codificadas en la línea germinal que reconocen tanto DAMPs como PAMPs expresados en distintos microorganismos. Estructuralmente los TLRs están formados por un ectodominio con múltiples repeticiones ricas en leucina, una porción transmembranal y un dominio Toll/receptor de IL-1 (TIR, del inglés Toll/IL-1R) en la región citoplasmática, el cual es encargado de iniciar la señalización intracelular. Algunos TLRs se localizan preferentemente en la membrana plasmática (TLR1, TLR5, TLR6 y TLR10) donde reconocen diversos PAMPs de ambiente extracelular mientras que otros se ubican en la membrana de los endosomas o del retículo endoplásmico (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11) donde detectan ácidos nucleicos de microorganismos y virus. Finalmente, solo el TLR4 puede estar presentes en ambos compartimentos (figura 2)⁶⁷.

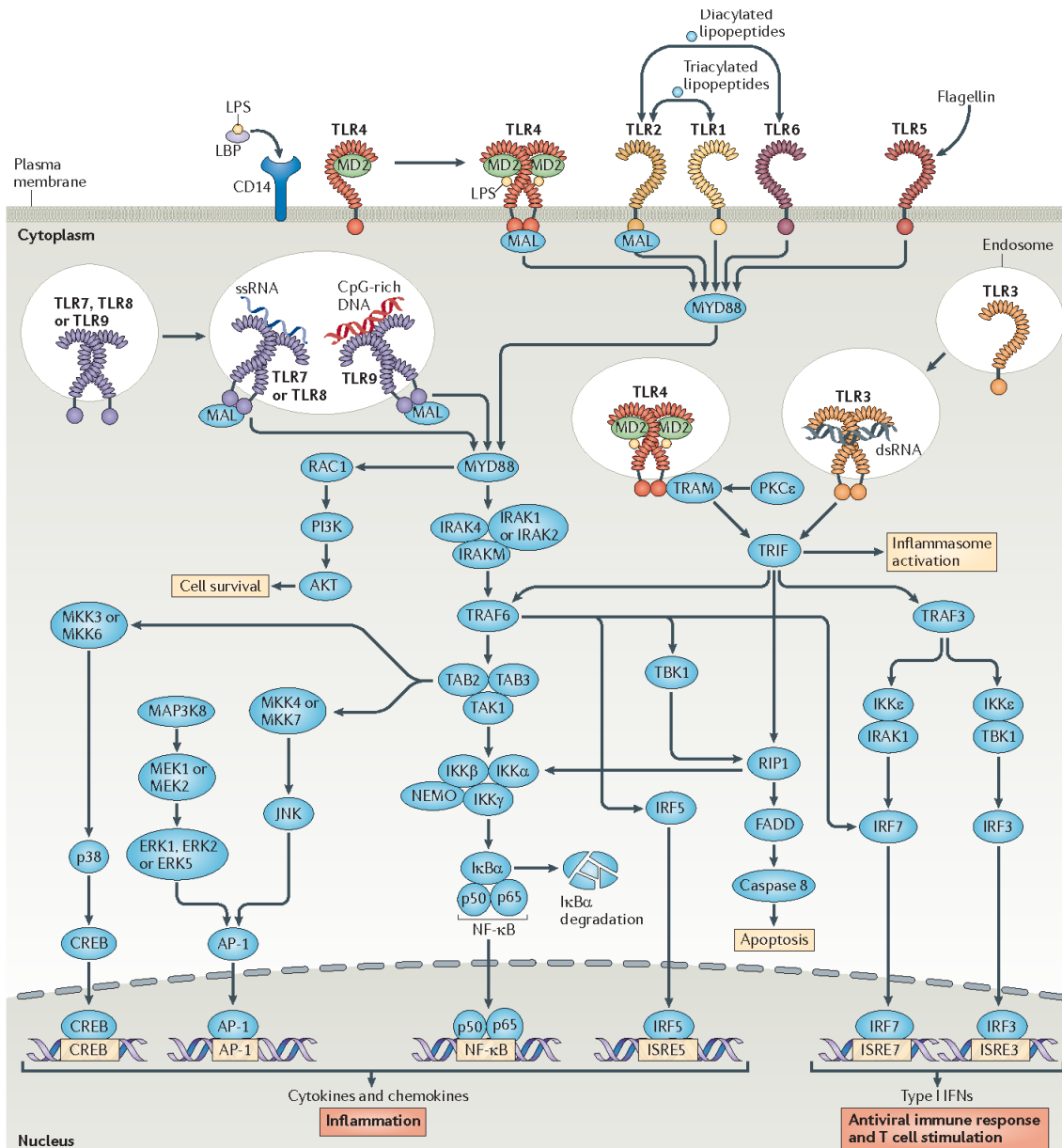


Figura 2. Vía de señalización de TLRs y sus ligandos. Gay et al. (2014)

Los TLRs pueden estar localizados en la superficie célula o en los endosomas donde detectan componentes microbianos o moléculas asociadas a daño. Después de su estimulación los TLRs pueden seguir dos rutas distintas que involucran ya sea a la molécula MyD88 o a la proteína adaptadora TRIF. La as señales evocadas de la vía dependiente de MyD88 llevan a la transcripción de genes de citocinas proinflamatorias, mientras que la vía dependiente de TRIF conduce a la expresión de IFNs tipo I.

De manera general, después de la unión a su ligando específico, los TLRs forman homodímeros con la excepción de TLR2 que se une a TLR1 para formar el complejo TLR2/1 y a TLR6 formando TLR2/6. En cualquiera de los casos esta dimerización genera un cambio conformacional que expone su dominio TIR para el reclutamiento de moléculas adaptadoras que llevan en última instancia a la

activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B, del inglés Nuclear factor-kappa B), y el factor regulador del interferón (IRF, del inglés Interferon regulatory factor). La vía de señalización de los TLRs sigue dos rutas diferentes dependiendo de la molécula adaptadora que se asocia al inicio de la misma, por un lado, se encuentra la vía dependiente de la proteína de respuesta primaria de diferenciación mielóide 88 (MyD88, del inglés Myeloid differentiation primary response 88) y por el otro tenemos la vía independiente de MyD88 también conocida como vía dependiente de la proteína adaptadora de dominio que induce interferón beta (TRIF del inglés TIR domain containing adaptor protein inducing IFN- β), las cuales se describen a continuación. La proteína MyD88 es una proteína adaptadora utilizada por casi todos los TLRs con excepción de TLR3, el cual se asocia de manera única a TRIF mientras que TLR4 puede unirse a ambas proteínas. En la vía dependiente de MyD88, esta proteína adaptadora se asocia al dominio TIR del TLR y a su vez forma un complejo con la proteína cinasa 4 asociada al receptor de IL-1 (IRAK-4, del inglés IL-1R-associated kinase 4), una interacción que depende de los dominios de muerte presentes en ambas proteínas. Esta unión permite que IRAK-4 se autofosforile y a continuación haga lo mismo la proteína cinasa 1 asociada al receptor de IL-1 (IRAK-1, del inglés IL-1R-associated kinase 1) ya que ambas poseen actividad intrínseca de Ser/Thr cinasa. La proteína IRAK1 una vez que se ha fosforilado, se asocia con el dominio RING del factor-6 asociado al receptor de TNF (TRAF6, del inglés tumor necrosis factor receptor-associated factor 6) que tiene actividad intrínseca de ubiquitina ligasa y se ubiquitina a sí misma promoviendo la activación del complejo de la cinasa-1 activadora del factor de crecimiento tumoral β (TAK1, del inglés Transforming growth factor beta-activated kinase 1) y las proteínas de unión a TAK1 2 y 3 (TAB, del inglés TAK1-binding protein). Sin embargo, TAK1 tiene dos sustratos directos por lo que la vía puede seguir dos rutas distintas, por un lado TAK1 activa la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK, del inglés Mitogen-activated protein kinases), logrando la activación de la proteína activadora 1 (AP-1, del inglés Activator protein 1) y por el otro TAK1 activa al complejo de la cinasa I κ B (IKK, del inglés I κ B kinase) que consiste en la proteína cinasa I κ B alfa (IKK α , del inglés I κ B kinase alpha), la cinasa I κ B beta (IKK β , del inglés I κ B kinase beta), la proteína cinasa I κ B gamma (IKK γ , del inglés I κ B kinase gamma) y el modulador esencial de NF- κ B (NEMO, del inglés NF- κ B essential modulator) que median la fosforilación del inhibidor de NF- κ B (I κ B, del inglés NF- κ B inhibitor). La fosforilación de I κ B, permite su subsecuente degradación en el proteasoma, lo que lo lleva a liberar al factor NF- κ B para su translocación al núcleo y activar la transcripción de genes involucrados en la respuesta inflamatoria, entre ellos los que

codifican para las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 e interleucina-1 beta (IL-1 β)⁶⁸⁻⁷⁰. En macrófagos alveolares, su activación al interactuar con *M. tuberculosis* es por el reconocimiento de lipoproteínas triaciladas y diaciladas presentes en su pared celular es a través de TLR1/2, TLR2/6. Por su parte, TLR4 también reconoce a la proteína de choque térmico 60/65 (HSP, del inglés Heat Shock Proteins) mientras que TLR9 se une a los motivos CpG no metilados del ADN de la bacteria una vez que ya ha sido fagocitada. Todo lo anterior desencadena en todos los casos a la activación de NF- κ B y por ende a la producción de citocinas proinflamatorias^{65,71}. Como se mencionó antes, TLR3 es el único receptor de esta familia que señala a partir de la vía independiente de MyD88. Cuando TLR3 se une a su ligando, la proteína adaptadora TRIF es reclutada y se pueden seguir dos caminos, por un lado, TRIF activa a TRAF6 lo que resulta en la activación de NF- κ B por la ruta antes descrita, y por otro lado, TRIF puede asociarse con el factor-3 asociado al receptor de TNF (TRAF3, del inglés TNF receptor-associated factor 6). TRAF3 a su vez recluta a la proteína cinasa de unión a TANK (TBK-1 del inglés TANK binding kinase 1) que en combinación con la cinasa I κ B épsilon (IKK ϵ , del inglés I κ B kinase épsilon) activa a los factores reguladores de interferón (IRFs, del inglés Interferon regulatory factors) 3 y 7 necesarios para la expresión de IFN tipo I. Cabe mencionar que TLR4 presente en el endosoma también puede señalar a través de TRIF, pero en este caso requiere de la molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM, del inglés TRIF-related adaptor molecule) que media el primer contacto.

1.3.2 Receptores tipo NOD

Dado que *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular, se ha observado que los NLRs son capaces de detectar al patógeno y contribuir a la estimulación de la respuesta inmune innata. Los NLRs son una familia de proteínas citosólicas que reconocen DAMPs y PAMPs intracelulares iniciando la defensa del hospedero a través de la activación de NF- κ B y caspasas. En cuanto a su estructura, los NLRs presentan al menos tres regiones, un dominio rico en repeticiones de leucina en el extremo C-terminal necesario para la detección del ligando, un dominio de oligomerización y unión a nucleotido (NACHT, del inglés Nucleotide binding and oligomerization domain) que permite la formación de oligómeros con otros NLRs, y un dominio efector variable en el extremo N-terminal que le permite acoplarse con diferentes señales. Se conocen al menos tres tipos de dominios efectores: el dominio de reclutamiento de caspasas (CARD, del inglés caspase recruitment domain), el dominio de unión a pirina (PYD, del inglés Pyrin domain) y el dominio inhibidor de baculovirus de repeticiones de proteínas de apoptosis (BIR, del inglés Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeats)⁷². Hasta

ahora se conocen 23 miembros de la familia de NLRs que se han clasificado de acuerdo al tipo de su dominio efector. NOD1 y NOD2 pertenecen a la subfamilia de NLRs que contiene dominios CARD. Mientras el patrón de expresión de NOD1 es ubicua, NOD2 se expresa en monocitos, macrófagos, células dendríticas y células de Paneth en el intestino. Además, ambos receptores reconocen peptidoglicanos presentes en la pared celular de las bacterias. Después de la detección de su ligando, NOD1 y NOD2 se oligomerizan y reclutan varias copias de la Ser/Thr cinasa RIP2. La ubiquitinación de RIP2 mediada por la ER ubiquitín ligasa del inhibidor de apoptosis ligado al cromosoma (XIAP, del inglés X-linked inhibitor of apoptosis) lleva al reclutamiento y activación del complejo TAK1/IKK que de manera similar a lo que ocurre con los TLRs puede activar la vía de MAP cinasas y al factor de transcripción NF- κ B⁸¹. Lo anterior da como resultado un incremento en la transcripción de mediadores inflamatorios. No obstante, además de la activación del factor de transcripción NF- κ B, los NLRs con regiones PYD (NLRP, del inglés NOD-like receptor Pyrin domain containing) están involucrados en la formación del inflamasoma⁷³. Cuando estos NLRPs son activados en presencia de productos microbianos o debido a la reducción del ion K⁺ en el citosol, se forma una plataforma proteica a través de interacciones homotípicas llamada inflamasoma. En el caso del inflamasoma formado por NLRP1, NLRP3 y NLRC4, la proteína como partícula que contiene CARD asociada a apoptosis (ASC, del inglés Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) es reclutada para activar la proforma de la caspasa-1 a través de la interacción de dominios de reclutamiento de caspasas presentes en ambas moléculas: Una vez activada la caspasa-1, ésta se encarga de realizar un corte en un residuo de aspartato en los precursores de IL-1 β e IL-18, lo que deja a estas citocinas en su forma activa para su secreción⁷⁴. Como se ha descrito, la transcripción de la procitocina IL-1 β es inducida por las señales que activan a NF- κ B y pueden provenir tanto de TLRs como de NLRs. Sin embargo, es necesaria la activación del inflamasoma para generar IL-1 β activa⁷⁴. En cuanto a *M. tuberculosis*, se sabe que el muramil dipéptido presente en su pared celular se une a NOD2 para inducir la secreción de TNF- α en células mononucleares humanas, mientras que en macrófagos y células dendríticas de ratón deficientes de NOD2 los niveles de TNF- α disminuyen en respuesta a *M. tuberculosis*^{75,76}.

1.3.3 Dectina-1

El receptor dectina-1 es una proteína de membrana tipo II con un dominio extracelular lectina tipo C que reconoce carbohidratos como los β -glucanos. Tal dominio se encuentra separado por una región de tlo y un dominio transmembranal seguido de una región citoplasmática que contiene un motivo

activador de inmunoreceptor basado en tirosinas (ITAM, del inglés Immunoreceptor Tyrosine-based activation motif), el cual media la señalización intracelular⁷⁷. Este receptor se encuentra expresado en células dendríticas, macrófagos, monocitos, neutrófilos, algunos grupos de células T y células B de origen humano. Hasta ahora no es claro que moléculas presentes en *M. tuberculosis* son reconocidos por el receptor delectina-1, sin embargo, se cree que los α -glucanos presentes en la bacteria pueden ser importantes para esta interacción⁷⁸. Asimismo, se ha encontrado que la secreción de TNF- α aumenta en ensayos donde se activan macrófagos murinos con un anticuerpo anti-delectina-1⁷⁹.

1.4 Proteínas adaptadoras de la familia SAP, características estructurales.

La funcionalidad de cualquier célula depende de su capacidad de reconocer señales de su medio ambiente y de convertir tal estímulo en una respuesta que regula funciones celulares específicas. Este reconocimiento se da a través de moléculas receptoras que una vez que se unen a su ligando específico sufren cambios conformacionales permitiendo transmitir dicha señal a otras moléculas en el interior de la célula con el fin de llevar a cabo una función biológica particular. Uno de los componentes principales en la transducción de la señal a nivel intracelular son las proteínas adaptadoras; éstas moléculas carecen de actividad enzimática, sin embargo, cuentan con dominios de unión a otras proteínas, lípidos u otros componentes celulares actuando como puentes moleculares para amplificar la cascada de señalización.

Particularmente se ha encontrado una familia de proteínas adaptadoras asociadas a los receptores SLAM (SAP, del inglés SLAM-associated protein) que participan como reguladores de la respuesta inmune innata y adaptativa al modular la función de tales receptores, la cual puede ser inhibitoria o activadora. Esta familia de proteínas está compuesta por tres miembros conocidos como SAP, el transcrito asociado al sarcoma de Ewing 1 (EAT-2, del inglés Ewing sarcoma-associated transcript), el transductor relacionado a EAT-2 (ERT, del inglés EAT-2 related transducer) cuya expresión es exclusiva de células inmunes¹⁸. Las proteínas de la familia SAP se encuentran formadas casi en su totalidad por un dominio con homología a Src 2 (SH2, del inglés Src homology 2 domain) (residuos 4-107) y una secuencia corta de 25-28 aminoácidos en el extremo C-terminal (residuos 108-132) dando como resultado una proteína con un peso aproximado de 15 kDa^{21,26}. Los tres miembros de la familia comparten una estructura de exones e intrones muy similar, sin embargo, mientras que el gen que codifica para SAP (*SH2D1A*, del inglés SH2 domain containing 1A) se encuentra localizado en el cromosoma X tanto en humano como en ratón, los genes que codifican para EAT-2 y ERT

(*SH2D1B* y *SH2D1C* respectivamente) se encuentran localizados en el cromosoma 1 en ambas especies^{26,27}. SAP comparte una homología del 47% con el dominio SH2 de EAT-2, mientras que los dominios SH2 de EAT-2 y ERT son homólogos en un 85% (Figura 3)^{18,27}. Como se mencionó antes, la expresión de esta familia de proteínas es única de células inmunes y diversos estudios han confirmado que SAP se expresa de manera abundante en células T, células NK, células T asesinas naturales (NK-T, del inglés Natural Killer T-cells), mientras que la proteína EAT-2 se expresa en células de la respuesta inmune innata tales como células NK, células dendríticas y macrófagos tanto en humano como en ratón^{21,23,26-29}. De manera particular, un estudio mostró que en monocitos humanos no clásicos (CD14⁺CD16⁺) que generalmente representan ~10% de los monocitos en sangre y producen altas cantidades de TNF- α en respuesta a LPS, el transcrito de EAT-2 es alrededor de 60 veces mayor con respecto al transcrito de monocitos clásicos (CD14⁺CD16⁻) los cuales representan el entre el 80% y el 90% de monocitos circulantes, esto sugiere que la expresión de EAT-2 varía incluso dentro de subpoblaciones celulares³⁰. Para el caso de la proteína ERT, esta se ha encontrado únicamente en células NK de ratón, y esto se debe a que en humano *SH2D1C* es un pseudogen^{27,29}.

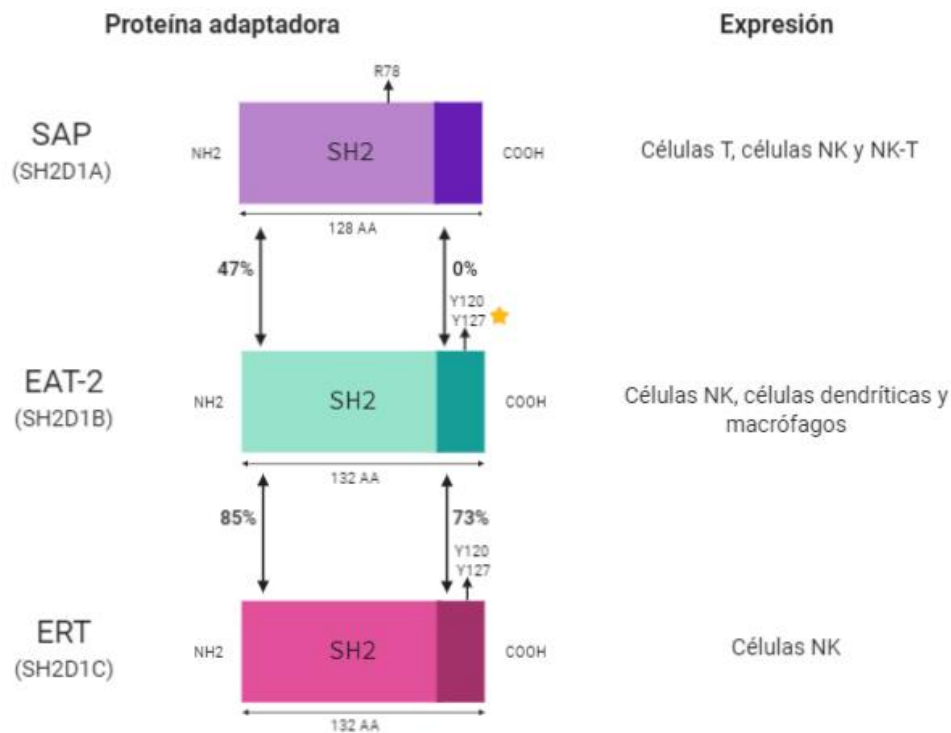


Figura 3. Estructura y expresión de las proteínas adaptadoras de la familia SAP.

Las proteínas de la familia SAP son proteínas pequeñas (≈ 15 kDa) compuestas casi en su totalidad por un dominio SH2 y una región corta de 25-28 aminoácidos en el extremo C-terminal. Aunque se expresan

únicamente en células inmunes, su expresión es diferencial. Los miembros de esta familia comparten una alta homología en su dominio SH2, sin embargo, diferencias de un solo aminoácido en su extremo C-terminal las hace funcionalmente distintas ya que mientras que EAT-2 recluta a PLC- γ a través de su Y127 fosforilada, SAP no cuenta con esta tirosina, en cambio recluta a la cinasa Fyn a través del residuo R78 de su dominio SH2.

1.5 Mecanismo de señalización de proteínas adaptadoras SAP

Dado que las proteínas adaptadoras de la familia SAP están compuestas casi en su totalidad por un dominio SH2, estas tienen la capacidad de unirse a tirosinas fosforiladas³¹⁻³². Tal fosforilación de tirosinas es un paso temprano en muchas vías de señalización y no es la excepción durante la activación de las moléculas activadoras de señalización de linfocitos (SLAM, del inglés Signalling lymphocytic activation molecule). Los receptores de la familia SLAM son un grupo de seis receptores de naturaleza proteica cuya expresión es exclusiva de células hematopoyéticas. Estos receptores son SLAMF1 (conocido como SLAM o CD150), SLAMF3 (Ly-9 o CD229), SLAMF4 (2B4 o CD244), SLAMF5 (CD84), SLAMF6 (conocido como Ly108 en ratón y NTB-A en humanos) y SLAMF7 (CRACC, CD319 o CS1)¹⁷. La familia de receptores SLAM son proteínas de membrana tipo I con una región extracelular compuesta de dos dominios tipo inmunoglobulina, uno variable y uno constante seguidos de una región transmembranal y una región citoplasmática que contiene una o más copias del motivo interruptor de inmunoreceptor basado en tirosinas (ITSM, del inglés immunoreceptor tyrosine-based switch motif) el cual es una secuencia consenso TIpYXXV/I (donde X puede ser cualquier aminoácido y pY una fosfotirosina) que contiene residuos de tirosina que pueden ser fosforilados por cinasas de la familia Src^{34,35}. Una característica importante de los receptores de la familia SLAM es que participan en interacciones homotípicas, es decir, funcionan como receptores y ligandos a la vez. Por ejemplo, el ligando para SLAMF1 es él mismo y así para todos los receptores con excepción de SLAMF4, el cual interactúa con una molécula llamada CD48, cuya expresión también es única de células inmunes, pero no es considerado un miembro de la familia SLAM¹⁷. Como se mencionó en un inicio, estos receptores tienen la cualidad de reclutar a las proteínas de la familia SAP con alta afinidad y lo hacen específicamente a través de los motivos ITSM. Sin embargo, existen ligeras diferencias en como ocurre esta interacción. Por ejemplo, se sabe que SAP se une a estos motivos de manera independiente de la fosforilación de los residuos de tirosina, mientras que para la unión de EAT-2, es necesario un evento de fosforilación^{26, 37}. Asimismo, en el caso particular de SLAMF7, este se asocia de manera exclusiva a EAT-2 pero no a SAP³³. A pesar de que estas proteínas comparten un alto grado de homología, su mecanismo de

señalización es distinto y su función ha sido principalmente descrita en células NK. En un inicio tanto a SAP como a EAT-2 se les atribuyó el termino de bloqueadores naturales. Lo anterior debido a que su unión a la región citoplasmática de los receptores SLAM impide la unión de otras proteínas con dominios SH2 como la fosfatasa 1 con dominios SH2 (SHP-1, del inglés SH2 domain-containing phosphatase 1) y la fosfatasa 2 con dominios SH2 (SHP-2, del inglés SH2 domain-containing phosphatase 1) o la de la polifosfatasa de inositol 1 con dominios SH2 (SHIP-1, del inglés SH2 containing inositol 5'-polyphosphatase). En consecuencia, la unión de las proteínas de la familia SAP, evita el efecto inhibitorio del receptor tras competir con la asociación por las fosfatasas SHP-1, SHP-2 o SHIP1^{26,37}. Estudios posteriores demostraron que estas proteínas adaptadoras no solo impedían la unión de otras proteínas con dominios SH2, sino que además son capaces de generar otras vías de señalización. SAP puede además reclutar a la proteína Fyn, una tirosina cinasa de la familia Src, mediante la interacción directa entre el residuo Arg78 del dominio SH2 de SAP y el dominio SH3 de Fyn. Una vez reclutada Fyn, se promueve la fosforilación del resto de los residuos de tirosina del receptor, dando pie a la formación de nuevos complejos de señalización (Figura 4)³⁶. Más tarde también se observó que el reclutamiento de Fyn lleva a la activación del factor intercambiador de nucleótidos de guanina Vav-1, el cual regula diversos procesos celulares asociados con la reorganización del citoesqueleto de actina como son el agrupamiento de balsas lipídicas, la formación de la sinapsis inmunológica entre células T y células presentadoras de antígeno, así como entre células NK y sus células blanco ^{38,39}.

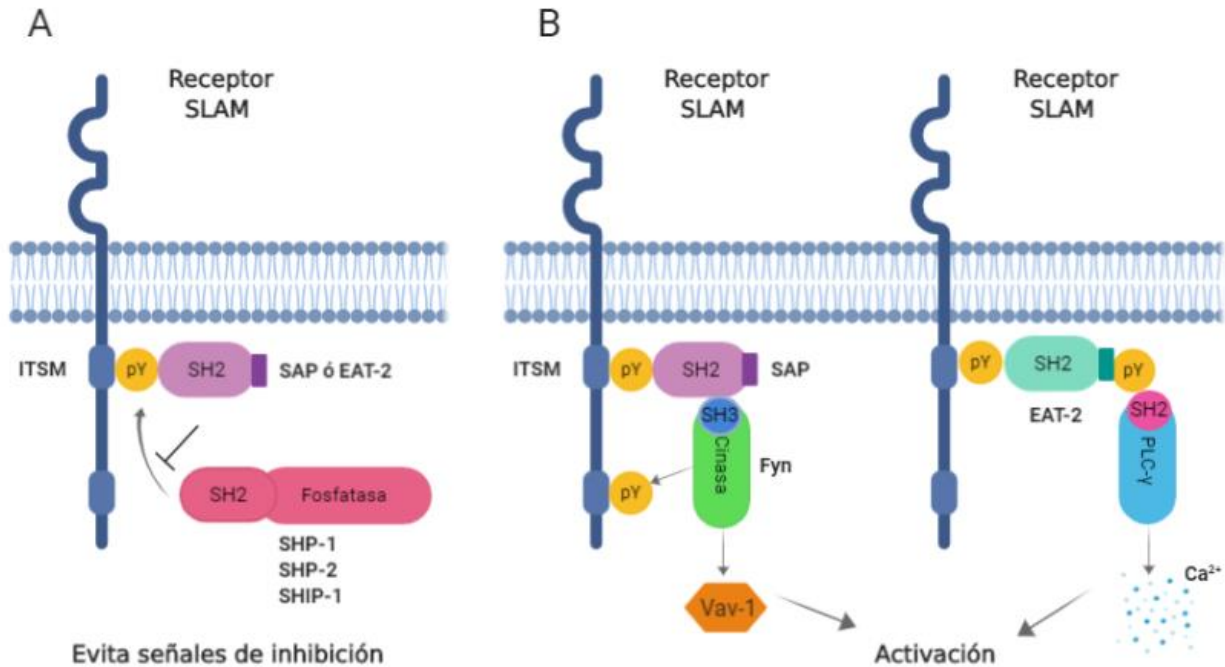


Figura 4. Mecanismo de señalización de las proteínas adaptadoras de la familia SAP.

A) Las proteínas de la familia SAP actúan como bloqueadores naturales ya que a través de la unión de su dominio SH2 con la tirosina del motivo ITSM del receptor SLAM impide la unión de otras proteínas con dominios SH2 incluyendo aquellas encargadas de señales de inhibición como las fosfatasas SHP-1/2 y SHIP-1. B) Los adaptadores de la familia de SAP transducen señales de activación a través del reclutamiento de proteínas efectoras. SAP a través del residuo de R78 en su dominio SH2 recluta a la cinasa Fyn encargada de fosforilar las tirosinas restantes del receptor SLAM y de activar al factor intercambiador de nucleótidos de guanina Vav-1 encargado de activar procesos de reorganización del citoesqueleto. EAT-2 por su parte recluta a PLC- γ a través del residuo Y127. La activación de PLC- γ lleva a un incremento en los niveles de Ca²⁺ intracelular.

A diferencia de SAP, EAT-2 y ERT no cuentan con un sitio de unión para la cinasa Fyn. En vez de esto, ambas proteínas comparten la presencia de dos residuos de tirosina en la posición 120 y 127 en su extremo C-terminal en el ratón, mientras que en humano EAT-2 solo se conserva el residuo Y127²¹. Una vez fosforilada la Y217 por cinasas de la familia Src, se favorece el reclutamiento de la proteína fosfolipasa C gamma (PLC- γ , del inglés Phospholipase C gamma) a través de una interacción de su dominio SH2 con la Y217 de EAT-2. Lo anterior resulta en un incremento en el flujo de Ca²⁺ intracelular y la activación de MAPK²³.

Las diferencias en su estructura y la capacidad de acoplar distintas señales, les da la facultad de regular la función de los receptores SLAM, lo que hace de las proteínas de la familia SAP un blanco de estudio interesante para esclarecer la función de un amplio rango de células hematopoyéticas y por ende del propio sistema inmune.

1.6 Función de las proteínas adaptadoras de la familia SAP

El estudio de la proteína SAP cobró relevancia desde que se identificaron a las que mutaciones en el gen que codifica para esta proteína (*SH2DIA*) están asociadas en un 50 a 70% al desarrollo del síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP, del inglés X-linked lymphoproliferative syndrome), una inmunodeficiencia primaria humana caracterizada por presentar una respuesta inmune ineficiente ante infecciones causadas por el virus de Epstein-Barr (VEB)²⁶. Hasta ahora, mutaciones en los genes que codifican para EAT-2 y ERT no se han asociado al desarrollo de alguna inmunodeficiencia, pero la ausencia de cualquiera de los miembros de esta familia de proteínas, tiene efectos sobre la funcionalidad de diversos tipos de células hematopoyéticas. Una estrategia para evaluar el efecto y función de estas proteínas ha sido la generación de ratones con mutaciones nulas (KO, del inglés Knockout) en los que los genes que codifican para estas proteínas están inactivados. En ratones deficientes en SAP, se ha visto una disminución en la producción de citocinas tipo T_{H2} como IL-4, IL-10 e IL-13, así como una disminución de la expresión de CD40L, que lleva a defectos en la formación de centros germinales y por lo tanto una disminución en la producción de anticuerpos^{40,41}. Por otro lado, la función citotóxica de células NK y la producción de IFN- γ ante la presencia de células hematopoyéticas transformadas también se ve afectada ante la falta de SAP, lo que lleva a plantear que SAP es un regulador positivo de la activación de los receptores SLAM en células NKs^{22,38}. Aunque el mecanismo por el cual SAP regula la citotoxicidad de células NK aún no es completamente claro, se sabe que su expresión es necesaria en la fase de formación del conjugado entre la célula NK y su célula blanco³⁸. Respecto a EAT-2 y ERT, inicialmente se observó que la falta de estas proteínas en células NK de ratón mejora su función citolítica, así como la secreción de IFN- γ mediada por el receptor 2B4. Estos resultados sugirieron que, a diferencia de SAP, EAT-2 y ERT actúan como reguladores negativos de la función de células NK de ratón²¹. Sin embargo, un estudio donde se analiza la función de SLAMF7, el cual se une de manera específica a EAT-2 pero no a SAP sugiere que EAT-2 es un regulador positivo de la función de células NK⁴². Este efecto también se observó en células NK de ratón con una doble deficiencia en EAT-2 y ERT, en donde la función citotóxica de las células NK se ve reducida para eliminar células hematopoyéticas transformadas. Lo anterior resulta ser más notable cuando hay una deficiencia en la expresión de los tres miembros de la familia de SAP. Estas observaciones apuntan a señalar que al igual que SAP, EAT-2 y ERT median señales de activación a través de los receptores SLAM y que trabajan en conjunto para mediar la activación

de la célula NK²². A diferencia de SAP, en células NK tanto de ratón como de humano, EAT-2 no tiene efecto sobre la formación de conjugados pero si la de favorecer la polarización del centro organizador de microtúbulos y gránulos líticos hacia la sinapsis inmunológica. Este efecto fue dependiente de la generación del flujo de Ca²⁺ ²³. En este mismo estudio se generó una versión mutante de la proteína EAT-2 humana en donde se sustituyó la tirosina de la posición 127 por fenilalanina. La sustitución de este residuo de tirosina, disminuye la capacidad con la que línea de células NKs de origen humano (YT-S) puede lisar células blanco. Este efecto también se acompañó de una disminución el flujo de Ca²⁺ y activación de PLC- γ , y de la MAPK. Estos resultados sugieren que EAT-2 a través de la tirosina 127 es importante para mediar señales que le permitan a la célula NK llevar a cabo su función citotóxica²³. Tal evidencia experimental apunta a que EAT-2 parece tener un rol más complejo en la regulación de la función de células inmunes a diferencia de SAP y que el conocimiento no del todo claro acerca de sus modos de acción hacen que EAT-2 represente una molécula de gran interés en el campo de la inmunología.

2. ANTECEDENTES

2.2 EAT-2 y su papel en la secreción de citocinas

Hasta ahora, poco se conoce sobre el impacto que tienen los receptores de la familia SLAM y las proteínas de la familia SAP en regular la secreción de citocinas en las células inmunes, en cambio, los estudios se han centrado en entender los mecanismos de señalización y su función en regular la respuesta inmune. Aunado a ello, el modelo de estudio más utilizado son células NK tanto de humano como de ratón aún cuando éstas moléculas se expresan de manera diferencial en células dendríticas, monocitos y macrófagos. Pese a esto, un estudio realizado en monocitos humanos obtenidos de sangre periférica de donantes de sangre sanos, reportó una disminución en la producción de TNF α una vez que las células son activadas con un anticuerpo anti-SLAMF7, y esto se relacionó con la ausencia de expresión de EAT-2 en estas células. Estos resultados sugieren que SLAMF7 inhibe la producción TNF α a nivel de proteína en monocitos como resultado de la ausencia de EAT-2 ⁴³. Otro estudio basado en el uso de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés Pheripheral blood mononuclear cells) que fueron transducidas con un vector que codifica para la proteína EAT-2, observaron un aumento en la concentración de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en el

sobrenadante, lo que sugiere que EAT-2 promueve la secreción de citocinas proinflamatorias, aunque es importante decir que en este trabajo no se determinó el nivel de ácido ribonucleico (ARN) mensajero de cada citocina lo cual ayudaría a confirmar esta hipótesis²⁴. Con el objetivo de profundizar sobre la función y mecanismos de acción de EAT-2 en células mieloides como son los monocitos o macrófagos, nuestro grupo, uso la línea celular THP-1 como un modelo de macrófagos humanos, los cuales se transdujeron con un vector que codifica para EAT-2 silvestre o una variante de EAT-2 en donde el residuo de tirosina en la posición 127 fue sustituido por fenilalanina (EAT-2 Y127F). Cuando las células THP-1 se activaron con LPS una vez diferenciadas a macrófagos, se observó que la expresión de EAT-2 regula de manera diferencial la secreción de citocinas. Mientras que no existieron cambios significativos en los niveles de secreción de IL-6 e IL-1 β en macrófagos que expresan EAT-2 WT o EAT-2 Y127F, la concentración de TNF- α en sobrenadante se vio drásticamente disminuida que expresan EAT-2 Y127F comparado con macrófagos que expresan EAT-2 silvestre o el vector vacío, esto en respuesta a un estímulo con LPS. Estos resultados sugieren que EAT-2 puede regular la secreción de citocinas en macrófagos humanos. Con el fin de conocer a qué nivel podría suceder esta regulación, se cuantificó el transcrito de cada citocina mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés Polymerase chain reaction) en tiempo real sin encontrar una diferencia significativa en el nivel de transcrito al expresar o no a la proteína EAT-2 (datos no publicados). Esto sugiere que la disminución en la producción de TNF- α en sobrenadante no se debe a un mecanismo de regulación a nivel transcripcional si no probablemente este asociado al proceso de secreción de esta citocina en particular. Este resultado es interesante, ya que se sabe que las citocinas IL-6 y TNF- α comparten todas las etapas de la vía de secreción en macrófagos excepto durante la fagocitosis en donde TNF- α se libera exclusivamente hacia la copa fagocítica mientras que IL-6 puede ser liberada en cualquier punto de la superficie celular¹⁴. Estos resultados nos permiten sugerir que la proteína adaptadora EAT-2 podría tener un papel sobre la vía de exocitosis de TNF- α y que probablemente este mecanismo sea dependiente de la tirosina 127 de EAT-2.

3. JUSTIFICACIÓN

El papel y mecanismos de acción de la proteína EAT-2 ha sido principalmente estudiado en células NK, sin embargo, células de origen mieloide como son los macrófagos y monocitos también expresan EAT-2. Aunado a lo anterior, estudios recientes muestran EAT-2 puede modular la producción de citocinas en células mieloides. Pese a ello, se desconoce el mecanismo por el cual EAT-2 regula esta función tan importante en el macrófago, por lo que el presente trabajo pretende conocer los mecanismos por los cuales EAT-2 regula la producción de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Lo anterior contribuirá a ampliar el conocimiento acerca de la función de EAT-2 en las células del sistema inmune.

4. HIPÓTESIS

La proteína adaptadora EAT-2 regula la secreción de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-1 β en macrófagos humanos por un mecanismo dependiente de su tirosina 127.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar si EAT-2 a través de su tirosina 127 regula la secreción de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-1 β en macrófagos humanos

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el impacto de la expresión de EAT2 Y127F sobre la secreción de TNF- α , IL-6 e IL-1 β en macrófagos humanos THP-1.
- Determinar el impacto de la expresión de EAT2 y127F sobre la transcripción de TNF- α , IL-6 e IL-1 β en macrófagos humanos THP-1.

7. METODOLOGÍA

7.1 Cultivo celular.

Los experimentos fueron realizados en la línea celular de monocitos de origen humano THP-1, (ATCC® TIB-202™) las cuales fueron transducidas independientemente con un vector retroviral pFB-GFP que tiene clonado el gen que codifica para la proteína humana EAT-2 WT (hEAT-2 WT), o que codifica para una mutante de EAT-2 en donde la tirosina 127 se sustituyó por fenilalanina (hEAT-2 Y127F). Como un control de transducción, también se empleó el vector pFB-GFP vacío. Todas las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco™ Advanced) suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado, 2mM de L-glutamina, 0.005 mM de 2-mercaptoetanol, 100 µg/ml estreptomina y 120 µg/ml de penicilina a una temperatura de 37°C y de 5% de CO₂. La densidad celular durante los cultivos no excedió los 1.5x10⁶ cel/mL. La determinación de la concentración y viabilidad celular en todos los casos se determinó por conteo de células en la cámara de Neubauer mediante el método de exclusión por azul de tripano.

7.2. Caracterización de las líneas celulares THP-1 pFB, THP-1 hEAT-2 WT y THP-1 hEAT-2 Y127F

Con el fin de conocer la expresión del gen reportero que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés Green fluorescent protein), se tomaron a células de cada línea celular y se lavaron con 1 mL de PBS pH 7.4, posteriormente se fijaron con 200µL de una solución de paraformaldehído al 2% (en PBS pH 7.4) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó el recuento y clasificación de las células de acuerdo a la expresión de GFP a través de un citómetro de flujo BD FACS Canto. Asimismo, se realizó un western blot para ver el patrón de expresión de las proteínas hEAT-2 WT y hEAT-2 Y127F en THP-1 sin diferenciar, en macrófagos THP-1 diferenciados con PMA y en macrófagos que recibieron un estímulo de 24 horas con BCG (Bacilo Calmette-Guérin, Cepa Tokio 172) MOI 4:1. Para lo anterior, se lisaron 4x10⁶ células con 400 µL de buffer TNE-T (Tris base 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2mM pH 8.0, Tritón 1%) en presencia del inhibidor de fosfatasa PhosSTOP e inhibidores de proteasas (Roche). La proteína total se cuantificó a partir del lisado total mediante el método de Bradford a una densidad óptica de 595 nm. Posteriormente se tomó el volumen necesario para cargar 75µg de proteína de cada muestra y se llevaron a una concentración final de 10% de β-mercaptoetanol. A continuación, las muestras se calentaron a 100° C durante 5 minutos para una completa

desnaturalización de la proteína. Las muestras desnaturalizadas se corrieron en un gel de poliacrilamida en un sistema discontinuo (gel compactador al 4% y gel separador al 15%) en presencia de SDS y a continuación se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Millipore) para realizar la inmunodetección. Una vez que se llevó a cabo la transferencia, se realizó el bloqueo de la membrana con buffer TNE/Tween al 0.05% con 5% de leche descremada en polvo en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora, esta misma solución se utilizó para incubar todos los anticuerpos utilizados. Entre cada paso de incubación se realizaron 5 lavados con buffer TNE/Tween al 0.05% sin leche en agitación durante 5 minutos. Posteriormente se incubó cada una de las fracciones de la membrana correspondientes al peso de la proteína hEAT-2, β -actina y GFP con el anticuerpo primario anti-SH2D1B de conejo (Proteintech antibodies, Cat. 1871-1-AP) a una dilución 1:1000, el anticuerpo anti β -actina de conejo (Cell Signaling Technology, Cat. 4967L) a una dilución 1:200 y el anticuerpo anti-GFP de conejo (Sigma, Cat. G1544) a una dilución 1:4000 respectivamente. Todos los anticuerpos primarios fueron incubados en agitación a temperatura ambiente durante 1.5 horas. Después de los lavados se incubó cada membrana con el anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a HRP (Cell Signaling Technology, Cat. 7074S) a una dilución 1:2000 en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente se detectó la señal utilizando un sustrato quimioluminiscente (UltraScience Pico Plus WS, GeneDirex, Cat. CCH321-B100ML) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

7.3 Evaluación de la producción de TNF- α , IL-6 e IL-1 β en macrófagos THP-1 en respuesta a un estímulo con BCG.

A partir de células THP-1 en cultivo que expresan la proteína EAT-2 WT, EAT-2 Y127F o el vector vacío se tomaron 5×10^4 células por pozo por triplicado en una placa de 96 pozos de fondo plano para diferenciarlas a macrófagos incubándolas con 50 ng/mL de PMA (del inglés phorbol 12-myristate 13-acetate) en medio RPMI suplementado a un volumen final de 200 μ L durante 60 horas. Posteriormente, se realizaron 2 lavados de cada pozo con medio RPMI (solo con antibiótico) y se añadieron 200 μ L de medio RPMI 1640 suplementado sin PMA, la placa se incubó a 37°C y de 5% de CO₂ durante 36 h. Una vez transcurrido el tiempo se realizaron 2 lavados de cada pozo con medio RPMI y se añadieron 200 μ L de medio X-VIVO™ 20 libre de suero (Lonza) dejando a las células en una fase de arresto durante 24 horas más a las mismas condiciones de incubación. Una vez que las células THP-1 se diferenciaron a macrófagos, estos se estimularon con una cepa atenuada de

Mycobacterium bovis (Bacilo Calmette-Guérin, Tuvax, Cepa Tokio 172, Laboratorios Silanes) a una MOI de 4:1 en un volumen final de 100 μ L de medio RPMI 1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino. Se utilizó una condición de no estímulo utilizando solo medio RPMI 1640 suplementado. La placa se incubó durante 24 horas a 37°C y de 5% de CO₂ y una vez transcurrido el tiempo se centrifugó la placa a 1500 rpm durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Las muestras de sobrenadante se almacenaron a -80° C hasta evaluar la producción de citocinas proinflamatorias mediante un kit de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) MAX Standard Set (Biolegend).

7.4 Análisis estadístico

Los datos presentados en las gráficas de secreción de citocinas se analizaron mediante una prueba paramétrica de análisis de varianza (ANOVA, del inglés Analysis of Variance) de dos vías y una prueba de *Comparaciones Múltiples de Tukey* con un valor $\alpha=0.05$. Los valores de *Fold change* se analizaron mediante un ANOVA de una vía con un valor $\alpha=0.05$. En cuanto a la expresión de CD14 en células THP-1 se realizó una prueba *t de Student* de dos colas para muestras independientes con un valor $\alpha=0.05$. En todos los casos se utilizó el programa GraphPad Prism v.6 para el análisis estadístico y elaboración de las gráficas presentadas.

8. RESULTADOS

8.1 Evaluación de la eficiencia de diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos.

La línea celular THP-1 es una línea de monocitos aislados de sangre periférica de un paciente de sexo masculino de 1 año con diagnóstico de leucemia monocítica aguda⁴⁴. Esta línea celular se ha utilizado como un sistema modelo para superar las limitaciones experimentales del uso de macrófagos primarios, y se ha convertido en una de las líneas celulares más utilizadas en investigaciones que buscan conocer la función efectora del macrófago⁴⁵. Las células THP-1 en su estado de monocitos pueden ser diferenciadas a macrófagos al ser expuestas a PMA (Forbol-12-Miristato-13-Acetato), ν D3 (1 α ,25-dihidroxitamina D3) o a M-CSF, sin embargo, PMA ha demostrado ser el agente de diferenciación más efectivo y el más usado para obtener macrófagos con un fenotipo similar al de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica⁴⁵⁻⁴⁷.

Con el objetivo de conocer si nuestro protocolo de diferenciación con PMA es eficiente, se midió la expresión de CD14 mediante citometría de flujo en monocitos THP-1 antes y después del tratamiento con 50 ng/mL de PMA.

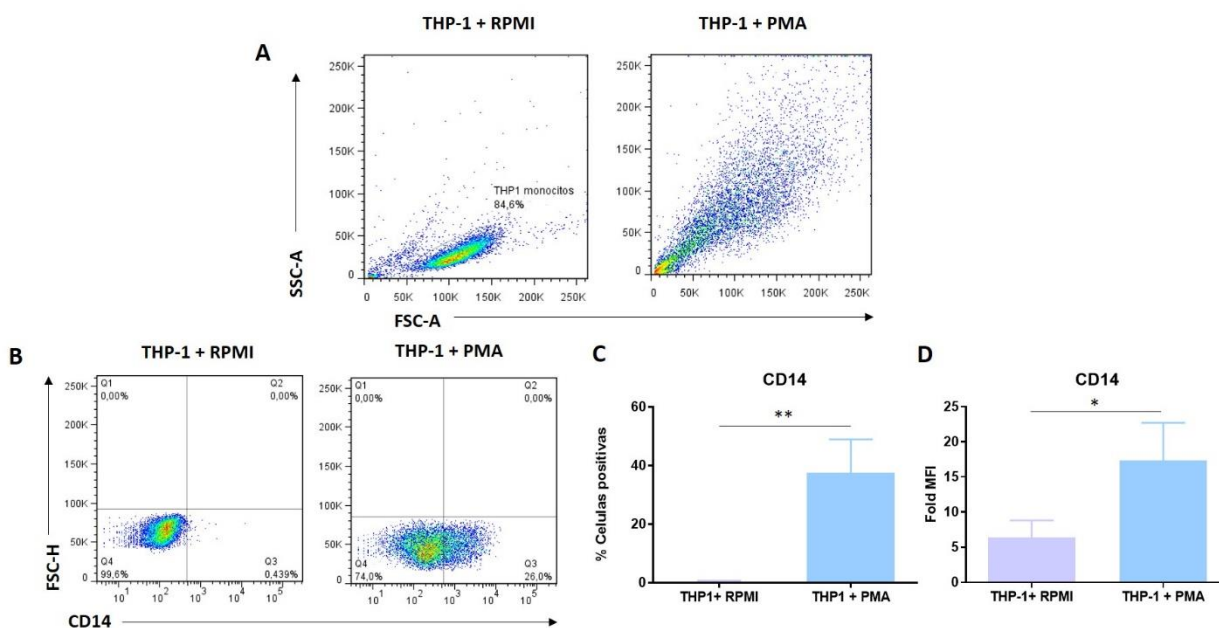


Figura 5. Expresión de CD14 en células THP-1 tratadas con PMA.

A) Complejidad (SSC-A) y tamaño (FSC-A) de las células THP-1 tratados o no con PMA. B) Expresión de CD14 en células THP-1 tratados o no con PMA, figura representativa de tres experimentos independientes. C) Media y desviación estándar de la expresión de CD14 obtenida de tres experimentos independientes. D) Media y desviación estándar de CD14 MFI (Median Fluorescence Intensities) obtenida de tres experimentos independientes.

Como se puede observar en la figura 5, cuando las células THP-1 crecieron en medio RPMI sin PMA, se observó una población homogénea de células con un tamaño y una complejidad celular menor, esto medido como la dispersión frontal (FSC-A) y dispersión lateral de luz (SSC-A) respectivamente mediante citometría de flujo. Sin embargo, cuando las células fueron expuestas a una concentración de 50 ng/ml de PMA durante 60 horas y después de 36 horas de arresto (en ausencia de PMA) la población se volvió más dispersa y aumentó de manera importante su granularidad sin haber un cambio importante en el tamaño. Estos cambios nos indican que efectivamente las células sufrieron un cambio morfológico que puede asociarse a un aumento en el número de lisosomas y vesículas endocíticas en su interior, cabe mencionar también que las células después de ser tratadas con PMA se adhieren a la placa de cultivo y se observaron al microscopio como células de forma irregular, de mayor tamaño y con una apariencia aplanada (datos no mostrados) lo cual coincide con lo reportado en la literatura^{47-49,51}.

Otro cambio que ha sido reportado es el aumento en la expresión de marcadores de superficie como CD14 y CD11b. Como lo muestran nuestros resultados en la figura 5B-C, los monocitos THP-1 no expresaron CD14 en condiciones normales de cultivo mientras que cuando fueron tratados con PMA el 37% de la población expresó este marcador. Asimismo, se observó que los monocitos THP-1 expresaron muy poco CD14 (MFI= 6.4 ± 2.4) y una vez que fueron tratados con PMA, su expresión aumentó 2.7 veces (MFI= 17.3 ± 5.3), lo cual coincide con lo reportado en la literatura^{46,48-50}. No obstante, no nos fue posible observar la expresión de CD11b en macrófagos THP-1, debido probablemente a que durante el proceso de desprendimiento de las células adheridas a la placa se remueve una gran parte de la molécula CD11b, la cual es una integrina que permite la adherencia a la superficie.

8.2 Expresión de la proteína adaptadora EAT-2 WT y EAT-2 Y127F en la línea celular THP-1.

De acuerdo con lo reportado, la línea celular THP-1 no expresa de manera endógena a la proteína EAT-2, por lo que esta línea celular fue transducida con el vector retroviral bistrónico pFB que tiene clonado el gen que codifica para GFP²⁵. Lo anterior facilita la identificación de células que fueron eficientemente transducidas a partir de la expresión de GFP la cual se puede detectar por citometría de flujo. Asimismo, las células se transdujeron con una construcción del vector pFB que

contiene el gen que codifica para la proteína humana EAT-2 con una sustitución de la tirosina 127 de su extremo C-terminal por una fenilalanina y finalmente, también se transdujeron células con el vector pFB sin inserto, las cuales se utilizaron como un control de transducción. Con el fin de comprobar que estas líneas celulares efectivamente expresan las proteínas de interés de manera similar, se realizó un ensayo de citometría de flujo para conocer el porcentaje de la población que expresa GFP.

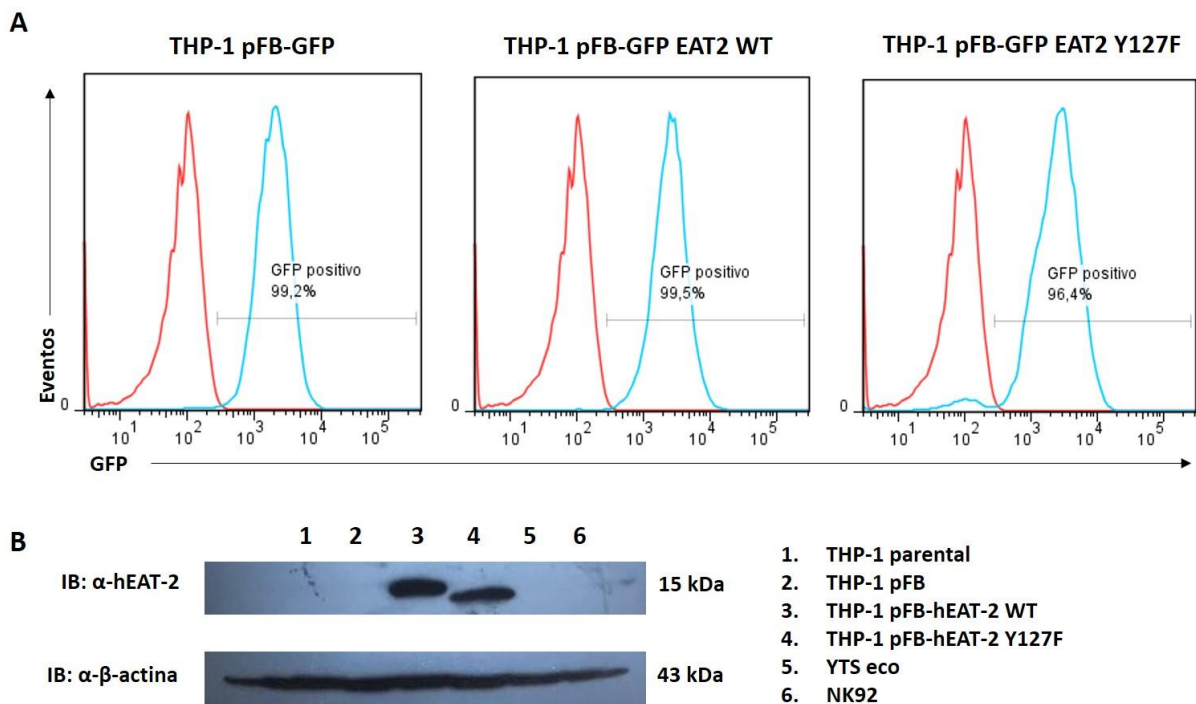


Figura 6. Expresión de las proteínas EAT-2 WT y EAT-2 Y127F en células THP-1.

A) Histograma del porcentaje de células positivas para GFP. B) Western blot de lisados celulares tratados con α -hEAT-2 y α - β -actina.

Como se observa en la figura 6A, el 99% de células THP-1 que fueron transducidas con el vector pFB vacío que expresan la proteína GFP. De igual forma el 99% de células THP-1 que fueron transducidas con el vector pFB-GFP-hEAT2 WT que expresaron el gen reportero y en el caso de las células que fueron transducidas con el vector pFB-GFP-hEAT2 Y127F el 96% de la población total fueron positivas para GFP. Estos resultados demuestran que las líneas celulares transducidas expresan en casi la totalidad de la población el gen de interés. Para confirmar la adecuada expresión de EAT-2, se realizó un western blot para detectar la expresión de hEAT-2 WT y hEAT-2 Y127F

(panel B de la figura 6). En este ensayo se utilizaron células THP-1 parentales y la línea celular de NKs de origen humano YTS eco como un control negativo, mientras que la línea celular NK-92 se utilizó como un control positivo. Como era de esperarse, las células THP-1 transducidas con el vector vacío no expresaron la proteína hEAT-2 (carril 2, figura 6B) mientras que en los carriles que corresponden a las células THP-1 pFB-GFP-hEAT2 WT y THP-1 pFB-GFP-hEAT2 Y127F se observó una banda que corresponde a 15 kDa, peso molecular de la proteína EAT-2, además de observarse un patrón de movilidad electroforética de acuerdo con lo reportado, dependiente del cambio del aminoácido²³.

Asimismo, se realizó un western blot para ver el patrón de expresión de las proteínas hEAT-2 WT y hEAT-2 Y127F en monocitos THP-1, en macrófagos THP-1 diferenciados con PMA y en macrófagos que recibieron un estímulo de 24 horas con BCG MOI 4:1 (figura 7). Para lo anterior, se lisaron 4×10^6 células con 400 μ L de buffer TNE-T (Tris base 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2mM pH 8.0, Tritón 1%) en presencia del inhibidor de fosfatasa PhosSTOP e inhibidores de proteasas (Roche). La proteína total se cuantificó a partir del lisado total mediante el método de Bradford a una densidad óptica de 595 nm. Posteriormente se tomó el volumen necesario para cargar 75 μ g de proteína de cada muestra y se llevaron a una concentración final de 10% de β -mercaptoetanol.

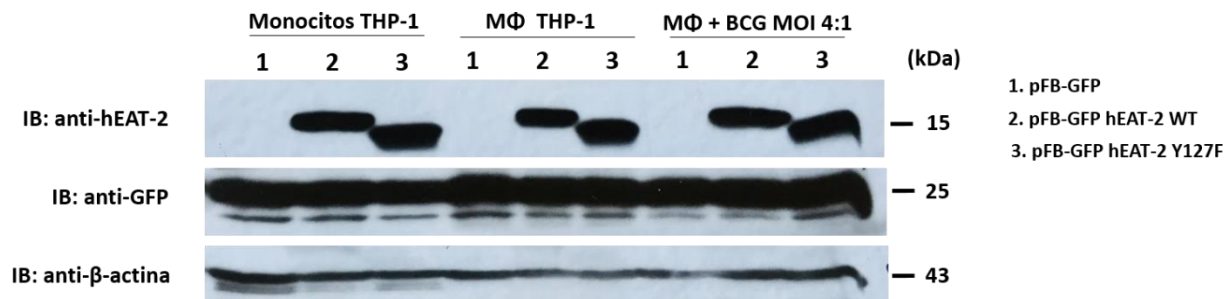


Figura 7. Expresión de las proteínas EAT-2 WT y EAT-2 Y127F en monocitos THP-1, MΦ y MΦ estimulados con *M. bovis*.

Se diferenciaron 4×10^6 células THP-1 con 50 ng/mL de PMA en dos placas de 50 mm durante 60 horas a 37°C al 5% CO₂, posteriormente se incubaron en medio RPMI sin PMA y 24 horas adicionales en medio RPMI sin suero siguiendo el protocolo de diferenciación descrito anteriormente. Las células de una de las placas fueron estimuladas con BCG a una MOI 4:1 durante 24 horas, mientras que las células de la segunda placa no fueron estimuladas con BCG y solo se cultivaron en medio RPMI. De manera simultánea se cultivaron monocitos THP-1 que no fueron tratados con PMA ni estimulados con BCG usados como control. Todas las células fueron lisadas al mismo tiempo como se describe en la metodología. Los primeros tres carriles corresponden a lisados de monocitos THP-1 transducidos con el vector pFB-GFP, pFB-GFP hEAT-2 WT y pFB-GFP hEAT-2 Y127F que no recibieron ningún estímulo. El segundo grupo de tres carriles

corresponde a macrófagos THP-1 que expresan las proteínas de interés que no fueron estimulados con BCG. El tercer grupo de tres carriles corresponde a macrófagos THP-1 que recibieron un estímulo de BCG a una MOI 4:1 durante 24 horas. Todos los lisados se trataron con anticuerpos α -hEAT-2, α -GFP y α - β -actina a las diluciones antes descritas.

Cabe mencionar que en este experimento no se midió la eficiencia de diferenciación celular mediante citometría de flujo pero si se observó la adherencia de las células a la placa y una morfología celular aplanada que se asocia a la forma de los macrófagos THP-1.

8.3 Estandarización del ensayo para la producción de citocinas proinflamatorias en macrófagos THP-1.

Como se mencionó anteriormente, los macrófagos son células altamente susceptibles a sufrir cambios como respuesta a las condiciones del ambiente en el que se encuentran. La presencia de ligandos para TLRs, IFN- γ y TNF- α propician que el macrófago sufra una activación clásica cuyos resultados son la eliminación de microorganismos y la producción de grandes cantidades de citocinas proinflamatorias, mientras que la presencia de IL-4, IL-10 e IL-13 lleva a los macrófagos a un estado de activación alternativa, la cual es importante para la regulación de la respuesta inflamatoria y remodelación de tejido⁷. Estos mismos cambios se han observado en macrófagos derivados de monocitos THP-1, los cuales en presencia de un estímulo inflamatorio como LPS (ligando para TLR4 y TLR2) adquieren la capacidad de producir citocinas proinflamatorias^{25,51-53}. Debido a ello evaluamos cómo diferentes concentraciones de LPS impactan en la activación de macrófagos diferenciados a partir de células THP-1 provenientes de dos bioreservorios de grupos de trabajo distintos. La secreción de citocinas se cuantificó a partir del sobrenadante a las 24 horas post-estímulo.

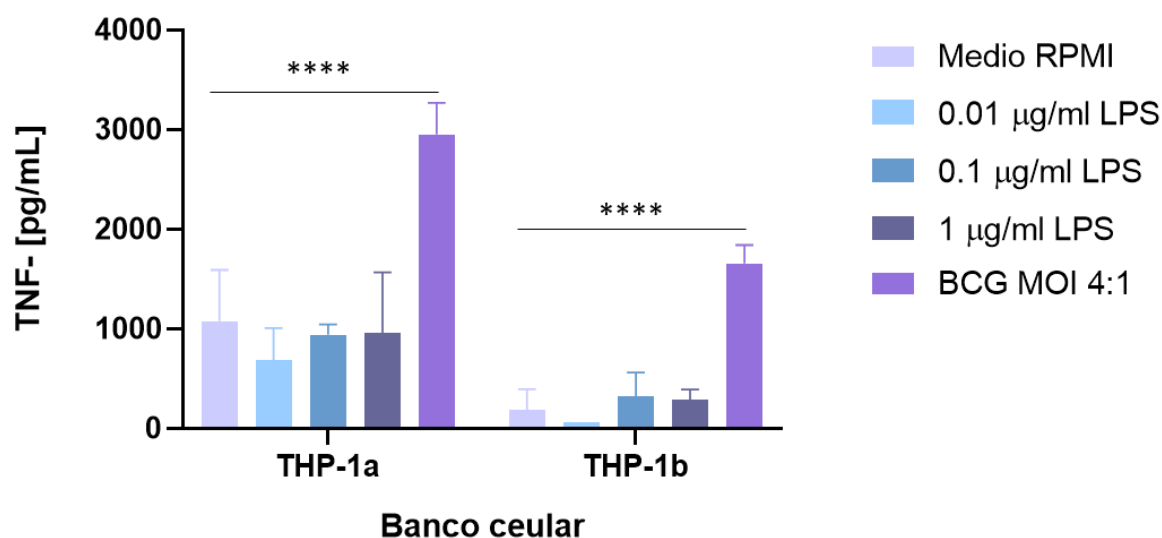


Figura 8. Producción de TNF- α en M Φ THP-1 parentales provenientes de dos grupos de trabajo.

Se diferenciaron 5×10^4 células THP-1 por pozo en una placa de 96 pozos con 50 ng/mL de PMA durante 60 horas a 37°C al 5% CO₂, posteriormente se incubaron en medio RPMI sin PMA y 24 horas adicionales en medio RPMI sin suero siguiendo el protocolo de diferenciación descrito anteriormente. Las células fueron estimuladas con 0.01, 0.1 y 1 μg/mL de LPS, así como con BCG a una MOI 4:1 durante 24 horas, cada condición por triplicado. Los sobrenadantes fueron recolectados y almacenados a -80°C hasta ser cuantificada la citocina TNF- α mediante ELISA.

Como se observa en la figura 8, encontramos diferencias en cuanto a la cantidad presente en el sobrenadante de TNF- α de los macrófagos diferenciados a partir THP-1 provenientes de ambos grupos de trabajo. En un caso, las células secretaron de manera basal TNF- α a una concentración de 1249 ± 515 pg/mL y esta cantidad no cambió en respuesta al tratamiento con LPS a concentraciones de entre 0.01 hasta 1 μg/mL. Este efecto también se observó para los macrófagos provenientes del segundo banco, aunque en este caso la cantidad de secreción basal fue menor. Cabe mencionar que el reactivo de LPS utilizado había sido reconstituido recientemente y se utilizó siempre bajo las condiciones recomendadas por el fabricante. Así mismo, se probó LPS de distintos fabricantes y con diferentes grados de pureza. Los resultados obtenidos fueron muy similares entre sí por lo que la ausencia de respuesta ante el estímulo con LPS fue independiente del fabricante y del grado de pureza. Por lo anterior, las células se estimularon con la vacuna comercial para tuberculosis BCG la cual consiste en una cepa de *Mycobacterium bovis* atenuada. Para este estímulo se usó una multiplicidad de infección ya reportada⁵³. Los resultados muestran que a diferencia de lo observado para LPS, los macrófagos de ambos grupos de trabajo producen

TNF- α en respuesta *M. bovis*. En cada caso, los macrófagos secretaron 2.7 y 8.8 veces más TNF- α comparado con aquellos que no recibieron estímulo. Por lo anterior, para todos los estudios subsecuentes se usó el estímulo con la vacuna BCG.

8.4 Evaluación del papel de EAT-2 en la producción de TNF- α , IL-6 e IL-1 β por macrófagos THP-1 estimulados con *Mycobacterium bovis*.

Con el fin de evaluar el papel de EAT-2 en la producción de TNF- α , IL-6 e IL-1 β en macrófagos THP-1, las células control y transgénicas para EAT-2 se estimularon con *Mycobacterium bovis* a una MOI de 4:1 durante 24 horas. Como referencia de estímulo, los macrófagos se dejaron sin estimular y solo se mantuvieron en medio RPMI suplementado con 5% de suero en ausencia de BCG.

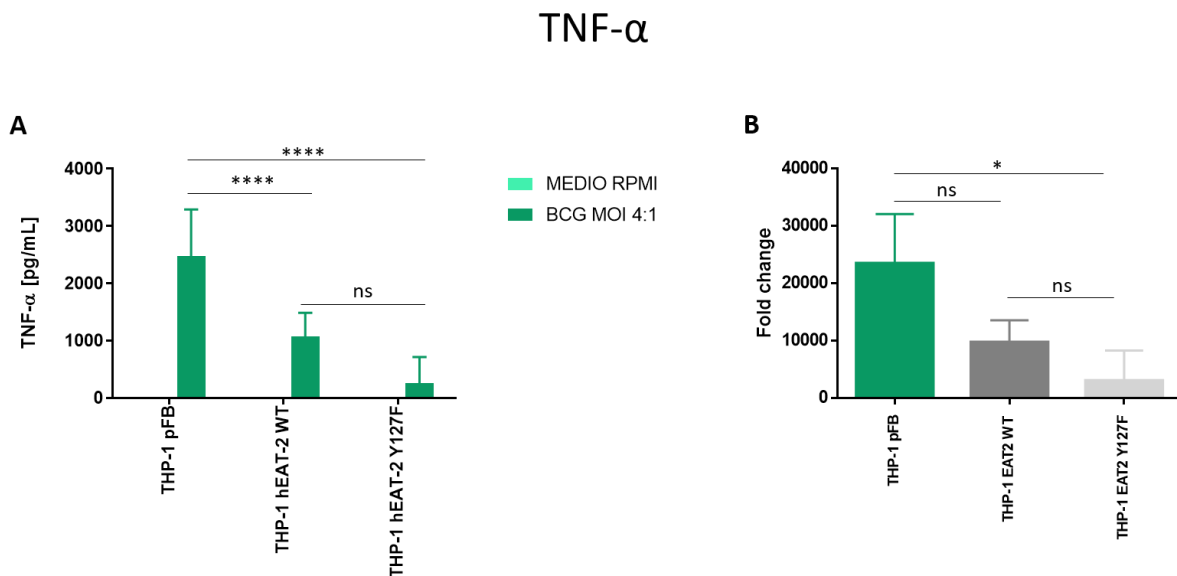


Figura 9. Producción de TNF- α en M Φ THP-1 que expresan EAT-2 WT y EAT-2 Y127F.

Se diferenciaron 5×10^4 células THP-1 por pozo en una placa de 96 pozos con 50 ng/mL de PMA durante 60 horas a 37°C al 5% CO₂, posteriormente se incubaron en medio RPMI sin PMA y 24 horas adicionales en medio RPMI sin suero siguiendo el protocolo de diferenciación descrito anteriormente. Las células fueron estimuladas con BCG a una MOI 4:1 durante 24 horas, cada condición por triplicado. Los sobrenadantes fueron recolectados y almacenados a -80°C hasta ser cuantificada la citocina TNF- α mediante ELISA.

De acuerdo a nuestros resultados, la producción de TNF- α aumentó como respuesta al estímulo con BCG en aquellas células que no expresan EAT-2 figura 9A. Las células que expresan la proteína EAT-2 WT, también respondieron al estímulo con BCG al incrementar la secreción de TNF- α con

respecto a las células que no recibieron estímulo, sin embargo, este aumento en la secreción de TNF- α fue significativamente menor comparada a la secreción observada en las células que no expresan EAT-2. Una disminución en la secreción de TNF- α se observó de manera más dramática cuando las células expresan la mutante de EAT-2, en donde la tirosina 127 se substituyo por una fenilalanina. Sin embargo, bajo estas condiciones no pudimos observar diferencias significativas en la secreción de TNF- α entre las células que expresan EAT-2 WT o EAT2 Y127F. Lo anterior nos permite sugerir que la expresión de EAT-2 reduce la secreción de TNF- α y que la ausencia de la tirosina 127 parece favorecer este efecto, sin embargo, no encontramos diferencias significativas con esta última condición respecto a la expresión de EAT-2 WT. Es importante mencionar que en todos los casos cuando las células no recibieron un estímulo la concentración de TNF- α fue prácticamente indetectable.

Con el fin de conocer si la expresión de EAT-2 influye sobre la capacidad que tienen los macrófagos de responder al estímulo con *M. bovis*, se calculó cuantas veces incrementa la secreción de TNF- α ante este estímulo comparado al estado basal, este valor se representó como *fold change*. Tomando en cuenta este valor, encontramos que únicamente la expresión de EAT-2 Y127F afectó la capacidad del macrófago para responder al estímulo con *M. bovis* respecto a los macrófagos sin estimular. Este efecto se observó mediante una disminución en la capacidad del macrófago para secretar TNF- α , ya que no se observó una diferencia significativa en la secreción de TNF- α en macrófagos estimulados en comparación con macrófagos sin estimular (figura 9B). Con lo anterior, podemos sugerir que si bien la expresión de EAT-2 influye en la cantidad de TNF- α que secreta el macrófago, la substitución de la tirosina 127 imposibilita al macrófago en su capacidad para responder a un estímulo mediante la secreción de TNF- α .

IL-6

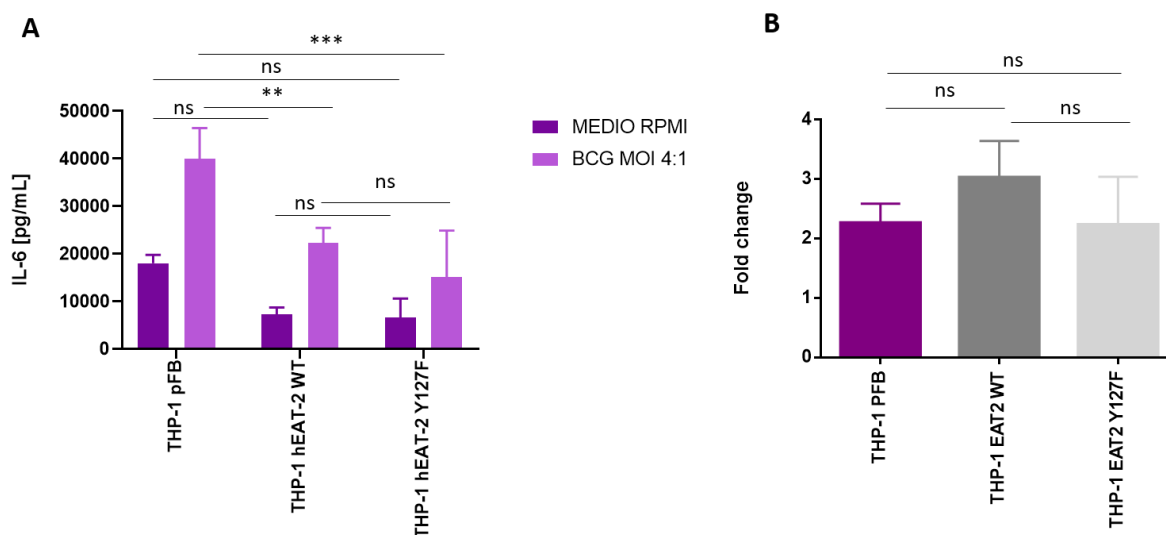


Figura 10. Producción de IL-6 en MΦ THP-1 que expresan EAT-2 WT y EAT-2 Y127F.

Se diferenciaron 5×10^4 células THP-1 por pozo en una placa de 96 pozos con 50 ng/mL de PMA durante 60 horas a 37°C al 5% CO₂, posteriormente se incubaron en medio RPMI sin PMA y 24 horas adicionales en medio RPMI sin suero siguiendo el protocolo de diferenciación descrito anteriormente. Las células fueron estimuladas con BCG a una MOI 4:1 durante 24 horas, cada condición por triplicado. Los sobrenadantes fueron recolectados y almacenados a -80°C hasta ser cuantificada la citocina IL-6 mediante ELISA.

Cuando evaluamos la expresión de otra citocina inflamatoria como IL-6, encontramos que los resultados fueron muy similares a los de TNF- α . Específicamente, observamos que la cantidad de IL-6 secretada por los macrófagos en respuesta a *M. bovis* fue mayor en aquellos que no expresan EAT-2 comparados con aquellos macrófagos que expresan la proteína adaptadora en su forma silvestre o en la mutante (figura 10A). Cabe destacar que a nivel basal la secreción de IL-6 no cambia en ninguno de los casos. Cuando analizamos la influencia de EAT-2 en la capacidad que tiene el macrófago para responder a un estímulo respecto a un nivel basal, valor expresado como fold change, no se observaron diferencias significativas en las células que expresan EAT-2 WT o EAT-2 Y127F con respecto a los macrófagos que no expresan EAT-2 (figura 10B). Estos resultados nos permiten sugerir que las diferencias en la cantidad de IL-6 que se secreta al medio en las diferentes condiciones no se debe a un efecto en la capacidad de respuesta de las células, sino que más bien EAT-2 regula intrínsecamente de manera negativa la cantidad de moléculas de IL-6 que se secretan por el macrófago.

IL-1 β

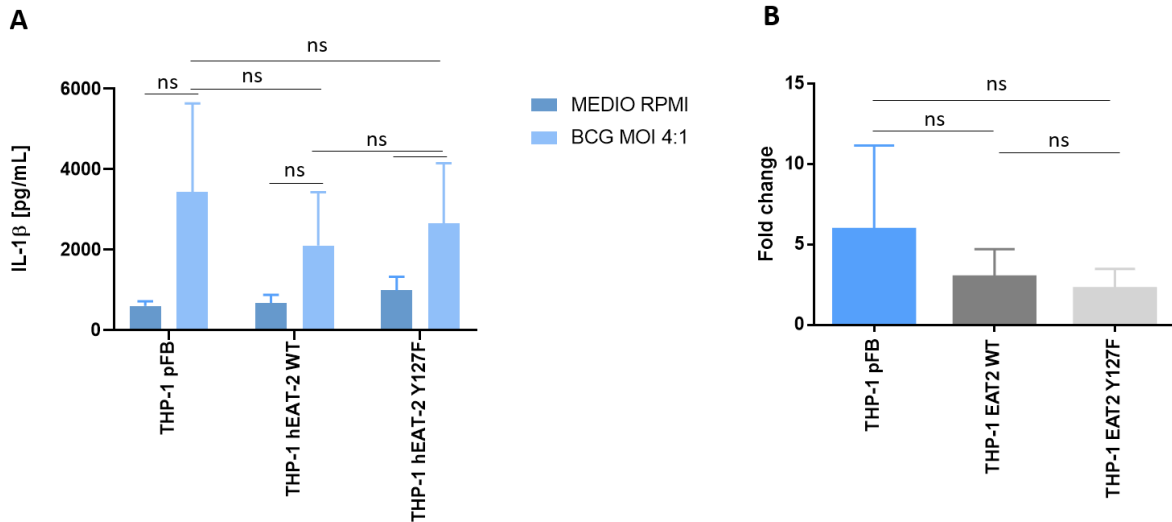


Figura 11. Producción de IL-1 β en M Φ THP-1 que expresan EAT-2 WT y EAT-2 Y127F.

Se diferenciaron 5×10^4 células THP-1 por pozo en una placa de 96 pozos con 50 ng/mL de PMA durante 60 horas a 37°C al 5% CO₂, posteriormente se incubaron en medio RPMI sin PMA y 24 horas adicionales en medio RPMI sin suero siguiendo el protocolo de diferenciación descrito anteriormente. Las células fueron estimuladas con BCG a una MOI 4:1 durante 24 horas, cada condición por triplicado. Los sobrenadantes fueron recolectados y almacenados a -80°C hasta ser cuantificada la citocina IL-1 β mediante ELISA.

Asimismo, fue de nuestro interés conocer el efecto de EAT-2 en la secreción de IL-1 β , sin embargo, a pesar de realizar numerosos ensayos de cuantificación por ELISA no encontramos diferencias significativas entre la condición de no estímulo y cuando fueron estimuladas con BCG. Tampoco se observaron diferencias significativas asociadas a la expresión de EAT-2 WT o EAT-2 Y127F. Lo anterior se puede deber a la variabilidad de los resultados observada entre cada experimento (figura 11).

9. DISCUSIÓN

Hasta ahora el papel de las proteínas adaptadoras de la familia SAP, así como de los receptores SLAM ha sido principalmente estudiado en células NK, a pesar de que ambas familias de moléculas se encuentran expresadas en varias células hematopoyéticas. Por lo anterior, ha sido nuestro interés ampliar el conocimiento acerca del papel y modos de acción de EAT-2 en otras células hematopoyéticas, particularmente a lo que se refiere a la influencia de EAT-2 en la producción de citocinas proinflamatorias en un modelo *in vitro* de macrófagos humanos. Nuestros resultados coinciden parcialmente con lo reportado por Gutiérrez-Guerrero, quien utilizando el mismo modelo de macrófagos derivados de monocitos THP-1 observó una reducción en la secreción de TNF- α en M Φ que expresan EAT-2 Y127F, sin embargo, bajo nuestras condiciones observamos que la sola expresión de EAT-2 WT disminuye la secreción TNF- α e IL-6 por lo que no logramos esclarecer si este efecto realmente sólo depende de la presencia de la tirosina 127. Sin embargo, observamos que las células que expresan EAT-2 Y127F no solo reducen la secreción de TNF- α sino también responden de manera distinta ante un estímulo con BCG, es decir, la falta de la tirosina 127 de alguna manera afecta la maquinaria del macrófago para responder ante un reto microbiano como *Mycobacterium bovis*. No obstante, mientras que en el trabajo anterior se utilizó LPS como inductor de la respuesta inflamatoria cuyo receptor es principalmente TLR4, *M. bovis* al ser un microorganismo completo cuenta con ligandos específicos para TLR2, TLR4, TLR9, NLRs, receptores scavenger, receptores de manosa y FcR, lo que se asemeja más a una condición fisiológica. Sin embargo, este mismo estímulo (BCG) hace al modelo más complejo al no conocer con exactitud cuál de todos los receptores, así como sus señales podrían estar siendo reguladas por EAT-2 y por lo tanto regular de manera diferencial la secreción de TNF- α e IL-6. Algo que es importante destacar es que en nuestro trabajo no encontramos evidencia de que EAT-2 pudiese afectar la secreción de IL-1 β . Lo anterior nos permite sugerir que EAT-2 pudiese estar afectando la vía de secreción de TNF- α e IL-6 ya que ambas citocinas, una vez que se sintetizan, son secretadas por la vía convencional, la cual consiste en la entrada al retículo endoplásmico hasta ser cargadas en vesículas que migran hacia el aparato de Golgi para continuar a través de la red trans-Golgi y luego transportarse en endosomas de reciclaje hasta la fusión con la membrana plasmática. Lo interesante es que ambas citocinas pueden compartir el mismo endosoma de reciclaje, así como las proteínas de tráfico VAMP-3 y Rab11a, las cuales son necesarias para la fusión con la membrana plasmática¹²⁻¹⁴. Por lo anterior, será de interés evaluar cuál es el nivel de expresión de TNF- α e IL-

6 en los endosomas de reciclaje cuando los macrófagos expresan EAT-2 y EAT-2 Y127F. Estos datos podrían darnos información sobre si EAT-2 modula la maquinaria del tráfico vesicular. Algo que es importante destacar es que a diferencia de TNF- α e IL-6, la forma activa de IL-1 β se secreta a través de una vía no convencional independiente de la entrada al retículo endoplásmico y al aparato de Golgi, por lo que no necesariamente EAT-2 pudiese estar afectando la secreción de IL-1 β como lo sería para el caso de TNF- α e IL-6. Sin embargo, dada la variabilidad de los resultados obtenidos en la cuantificación de IL-1 β , no podemos concluir nada al respecto. Una perspectiva importante del proyecto sería evaluar el efecto de EAT-2 en la secreción de citocinas proinflamatorias en otros modelos de macrófagos ya establecidos, por ejemplo, como aquel que depende del uso de la línea celular de macrófagos de origen murino RAW 264.7. Una ventaja de este modelo es que no se requiera de un estímulo previo para su diferenciación como en el caso de los monocitos THP-1, en el cual el PMA además de diferenciarlos a macrófagos induce un estado de activación.

No obstante, algunos trabajos son contrarios a lo que nosotros observamos, por ejemplo, en un artículo donde sobreexpresan EAT-2 en PBMCs de origen humano se observa que aumenta la expresión de TNF- α , IL-6, IL-1 β y MIP-1 α , así como de IL-10, IL-17 e IL-1 α sugiriendo que EAT-2 regula positivamente la secreción de estas citocinas ²⁴. Otro estudio mostró que una población de monocitos humanos CD14⁺ que expresan SLAMF7, pero carecen de la expresión de EAT-2, al ser activados con un anticuerpo anti-SLAMF7 más LPS se observa una disminución en la expresión de TNF- α . Este trabajo, sugiere que el efecto inhibitorio de SLAMF7 sobre la secreción de TNF- α se debe a la ausencia de EAT-2 y que EAT-2 entonces podría estar regulando positivamente la secreción de TNF- α ⁴³. Por otro lado, aunque no es un efecto que dependa completamente de EAT-2, se ha visto que en macrófagos peritoneales de ratón carentes del receptor SLAMF1 la producción de TNF- α e IL-12 disminuye en respuesta a la activación por LPS e IFN- γ , mientras que estos mismos estímulos inducen una mayor expresión de IL-6⁵⁵. Sin embargo, en estos trabajos no se reporta cual es la abundancia de los otros miembros de la familia de proteínas adaptadoras SAP, lo cual es importante ya que también participan como reguladores de la función de los receptores SLAM.

Aunque el mecanismo de la proteína EAT-2 ha sido descrito hasta ahora a nivel de señalización celular debido a su naturaleza de proteína adaptadora, no se puede descartar que EAT-2 sea capaz de interactuar con moléculas diferentes a los receptores SLAM. Recientemente se demostró que los

receptores SLAM pueden unirse a proteínas implicadas en el tráfico vesicular: En un estudio en el que utilizaron macrófagos humanos, se observó que durante la fagocitosis de *E. coli* se promueve la activación de la GTPasa Rab11 que una vez activada recluta al receptor SLAMF1 y a la molécula TRAM (la cual se encarga de unir TRIF a TLR3 y TLR4) hacia el fagosoma a través de proteínas efectoras de la familia Rab11 (FIP del inglés Rab11-family interacting proteins) clase I⁸⁰. Cabe mencionar que tal interacción es independiente de la fosforilación de los motivos ITSM y aunque en este estudio no se mostró el papel de las proteínas adaptadoras, este constituye el primer reporte que habla de la interacción directa de los receptores SLAM con proteínas involucradas en el tráfico vesicular, lo que abre la posibilidad de que EAT-2 también pudiera estar siendo reclutada a este compartimento durante la fagocitosis ya sea por la unión propia al receptor SLAM o por la interacción directa con otras proteínas. Por lo anterior, sería interesante realizar ensayos de microscopía o bioquímica de proteínas para conocer la localización de EAT-2 durante el tráfico vesicular de TNF- α e IL-6 y si existe una interacción de la proteína EAT-2 con proteínas diferentes a los receptores.

Hasta ahora no existen reportes en la literatura que hablen acerca de la función de EAT-2 como regulador de la transcripción y tampoco tenemos claro si las diferencias observadas en los niveles de TNF- α e IL-6 en el sobrenadante sean solo a nivel de proteína, por lo que uno de los objetivos de este trabajo era conocer el papel de la proteína EAT-2 en la transcripción de los genes que codifican para TNF- α , IL-6 e IL-1 β , sin embargo, no fue posible alcanzar el objetivo. A pesar de que se estandarizaron las condiciones para cuantificar el transcrito de las citocinas mediante la técnica de PCR en tiempo real, solo se pudo realizar un ensayo de cuantificación de las muestras por lo que no nos aventuramos a realizar conclusiones.

No obstante, sabemos que el mecanismo de transcripción de genes de citocinas proinflamatorias a partir de un estímulo inflamatorio, de estrés o infeccioso se encuentra altamente regulado e implica una amplia variedad de participantes entre ellos varios factores de transcripción que son específicos del tipo celular y del estímulo⁵⁶⁻⁵⁸. En los macrófagos se sabe que el enhanceosoma formado durante la transcripción de TNF- α en respuesta a LPS o *Mycobacterium tuberculosis* está compuesto por Ets-1, Elk-1, Sp1, Egr-1, ATF-1/c-Jun. Otros reportes muestran que la región 5' del gen TNF- α en las células THP-1 cuenta con elementos de respuesta para la unión de las proteínas p50, p65 y RelB pertenecientes a la familia de NF- κ B⁵⁹. En cuanto a la regulación de la expresión del gen de IL-6 se

conocen varios factores de transcripción que se unen a la región 5', como los elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE, del inglés Glucocorticoid response element), un sitio de unión para AP-1 seguido de un elemento de respuesta de AMPc (CRE) y otro más para la unión de las proteínas p50/p65⁶⁰. En el caso del gen de IL-1 β se sabe que su promotor tiene un sitio de unión para NF κ B que se ha visto es importante para la transcripción del gen a través de la inducción por LPS, sin embargo, este sitio no es suficiente para alcanzar una completa activación de la transcripción para ello se requiere de un elemento de respuesta adicional para la unión de los factores de transcripción IRF/PU.1⁶¹⁻⁶³.

Como se ha descrito, la mayoría de las activaciones de los factores transcripcionales involucran la activación de señales que emanan a través de receptores de reconocimiento, sin embargo, se ha visto que en monocitos THP-1, la transcripción de TNF- α e IL-1 β se induce en respuesta al tratamiento con PMA⁵¹, por lo que sería importante utilizar otro modelo de estudio en el que el PMA no fuera un factor que induce la activación de factores de transcripción. En función de lo anterior, también desconocemos si la proteína EAT-2 puede regular la transcripción de los genes para citocinas proinflamatorias, por lo que también es importante evaluar este escenario.

10. CONCLUSIONES

- EAT-2 WT regula negativamente la producción de TNF- α e IL-6.
- La expresión de la proteína EAT-2 Y127F disminuye la capacidad de respuesta de la célula en secretar TNF- α ante un estímulo con *Mycobacterium bovis*.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar la influencia de la proteína EAT-2 sobre la secreción de TNF- α , IL-6 e IL-1B en un modelo de macrófagos de origen murino como las células RAW264.7
- Evaluar el nivel de ARNm de cada citocina con el fin de esclarecer el mecanismo de regulación de EAT-2.

12. REFERENCIAS

1. van Furth, R., Cohn, Z. A., Hirsch, J. G., Humphrey, J. H., Spector, W. G., & Langevoort, H. L. (1972). The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization*, 46(6), 845. *
2. Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews immunology*, 11(11), 723.
3. Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews immunology*, 5(12), 953.
4. Perdiguero, E. G., & Geissmann, F. (2016). The development and maintenance of resident macrophages. *Nature immunology*, 17(1), 2.
5. Kumar, S., & Jack, R. (2006). Invited review: origin of monocytes and their differentiation to macrophages and dendritic cells. *Journal of endotoxin research*, 12(5), 278-284.
6. Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*, 25(12), 677-686.
7. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., & Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*, 23(11), 549-555.
8. Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation*, 122(3), 787-795.
9. Flannagan, R. S., Jaumouillé, V., & Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7, 61-98.
10. Taylor, P. R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H. H., Brown, G. D., & Gordon, S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 901-944.
11. Billack, B. (2006). Macrophage activation: role of toll-like receptors, nitric oxide, and nuclear factor kappa B. *American journal of pharmaceutical education*, 70(5), 102.
12. Arango Duque, G. & Descoteaux, A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology* 5, (2014).
13. Murray, R. Z. & Stow, J. L. Cytokine Secretion in Macrophages: SNAREs, Rabs, and Membrane Trafficking. *Frontiers in Immunology* 5, (2014).

14. Manderson, A. P., Kay, J. G., Hammond, L. A., Brown, D. L. & Stow, J. L. Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNF α . *The Journal of Cell Biology* 178, 57–69 (2007).
15. Eder, C. (2009). Mechanisms of interleukin-1 β release. *Immunobiology*, 214(7), 543-553.
16. Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T. & Pennington, D. J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843, 2563–2582 (2014).
17. Wu, N., & Veillette, A. (2016). SLAM family receptors in normal immunity and immune pathologies. *Current opinion in immunology*, 38, 45-51.
18. Veillette, A. (2006). Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nature Reviews Immunology*, 6(1), 56.
19. Veillette, A., Cruz-Munoz, M. E., & Zhong, M. C. (2006). SLAM family receptors and SAP-related adaptors: matters arising. *Trends in immunology*, 27(5), 228-234.
20. Ostrakhovitch, E. A., & Li, S. S. C. (2006). The role of SLAM family receptors in immune cell signaling. *Biochemistry and cell biology*, 84(6), 832-843.
21. Roncagalli, R., Taylor, J. E., Zhang, S., Shi, X., Chen, R., Cruz-Munoz, M. E., ... & Veillette, A. (2005). Negative regulation of natural killer cell function by EAT-2, a SAP-related adaptor. *Nature immunology*, 6(10), 1002.
22. Dong, Z., Cruz-Munoz, M. E., Zhong, M. C., Chen, R., Latour, S., & Veillette, A. (2009). Essential function for SAP family adaptors in the surveillance of hematopoietic cells by natural killer cells. *Nature immunology*, 10(9), 973.
23. Pérez-Quintero, L. A., Roncagalli, R., Guo, H., Latour, S., Davidson, D., & Veillette, A. (2014). EAT-2, a SAP-like adaptor, controls NK cell activation through phospholipase C γ , Ca $^{++}$, and Erk, leading to granule polarization. *Journal of Experimental Medicine*, 211(4), 727-742.
24. Aldhamen, Y. A., Seregin, S. S., Aylsworth, C. F., Godbehere, S., & Amalfitano, A. (2013). Manipulation of EAT-2 expression promotes induction of multiple beneficial regulatory and effector functions of the human innate immune system as a novel immunomodulatory strategy. *International immunology*, 26(5), 291-303.
25. Gutiérrez A. Influencia de la proteína EAT-2 sobre la secreción de citocinas inflamatorias en un modelo de macrófagos humanos. (2017).

26. Sayos, J., Wu, C., Morra, M., Wang, N., Zhang, X., Allen, D., ... & Oettgen, H. (1998). The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature*, 395(6701), 462.
27. Calpe, S., Erdős, E., Liao, G., Wang, N., Rietdijk, S., Simarro, M., ... & Rajnavölgyi, É. (2006). Identification and characterization of two related murine genes, Eat2a and Eat2b, encoding single SH2-domain adaptors. *Immunogenetics*, 58(1), 15-25.
28. Schlums, H., Cichocki, F., Tesi, B., Theorell, J., Beziat, V., Holmes, T. D., ... & Larsson, S. (2015). Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity*, 42(3), 443-456.
29. Veillette, A. (2010). SLAM-family receptors: immune regulators with or without SAP-family adaptors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(3), a002469.
30. Frankenberger, M., Hofer, T. P., Marei, A., Dayyani, F., Schewe, S., Strasser, C., ... & Costa, O. P. D. (2012). Transcript profiling of CD 16-positive monocytes reveals a unique molecular fingerprint. *European journal of immunology*, 42(4), 957-974.
31. Pawson, T., Gish, G. D., & Nash, P. (2001). SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends in cell biology*, 11(12), 504-511.
32. Schlessinger, J., & Lemmon, M. A. (2003). SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci. STKE*, 2003(191), re12-re12.
33. Tassi, I., & Colonna, M. (2005). The cytotoxicity receptor CRACC (CS-1) recruits EAT-2 and activates the PI3K and phospholipase C γ signaling pathways in human NK cells. *The Journal of Immunology*, 175(12), 7996-8002.
34. Cannons, J. L., Tangye, S. G., & Schwartzberg, P. L. (2011). SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annual review of immunology*, 29, 665-705.
35. Poy, F., Yaffe, M. B., Sayos, J., Saxena, K., Morra, M., Sumegi, J., ... & Eck, M. J. (1999). Crystal structures of the XLP protein SAP reveal a class of SH2 domains with extended, phosphotyrosine-independent sequence recognition. *Molecular cell*, 4(4), 555-561.
36. Chan, B., Lanyi, A., Song, H. K., Griesbach, J., Simarro-Grande, M., Poy, F., ... & Eck, M. J. (2003). SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nature cell biology*, 5(2), 155.
37. Morra, M., Lu, J., Poy, F., Martin, M., Sayos, J., Calpe, S., ... & Coyle, A. J. (2001). Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *The EMBO journal*, 20(21), 5840-5852.

38. Dong, Z., Davidson, D., Pérez-Quintero, L. A., Kurosaki, T., Swat, W., & Veillette, A. (2012). The adaptor SAP controls NK cell activation by regulating the enzymes Vav-1 and SHIP-1 and by enhancing conjugates with target cells. *Immunity*, *36*(6), 974-985.
39. Hornstein, I., Alcover, A., & Katzav, S. (2004). Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. *Cellular signalling*, *16*(1), 1-11.
40. Wu, C., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Wang, N., Gullo, C., Howie, D., ... & Sharpe, A. H. (2001). SAP controls T cell responses to virus and terminal differentiation of T H 2 cells. *Nature immunology*, *2*(5), 410.
41. Veillette, A., Zhang, S., Shi, X., Dong, Z., Davidson, D., & Zhong, M. C. (2008). SAP expression in T cells, not in B cells, is required for humoral immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(4), 1273-1278.
42. Cruz-Munoz, M. E., Dong, Z., Shi, X., Zhang, S., & Veillette, A. (2009). Influence of CRACC, a SLAM family receptor coupled to the adaptor EAT-2, on natural killer cell function. *Nature immunology*, *10*(3), 297.
43. Kim, J. R., Horton, N. C., Mathew, S. O., & Mathew, P. A. (2013). CS1 (SLAMF7) inhibits production of proinflammatory cytokines by activated monocytes. *Inflammation Research*, *62*(8), 765-772..
44. Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International journal of cancer*, *26*(2), 171-176.
45. Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *International immunopharmacology*, *23*(1), 37-45.
46. Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K., & Dockrell, D. H. (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS one*, *5*(1), e8668.
47. Lund, M. E., To, J., O'Brien, B. A., & Donnelly, S. (2016). The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *Journal of immunological methods*, *430*, 64-70.
48. Aldo, P. B., Craveiro, V., Guller, S., & Mor, G. (2013). Effect of culture conditions on the phenotype of THP-1 monocyte cell line. *American journal of reproductive immunology*, *70*(1), 80-86.

49. Schwende, H., Fitzke, E., Ambs, P., & Dieter, P. (1996). Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *Journal of leukocyte biology*, 59(4), 555-561.
50. Mittar, D., Paramban, R., & McIntyre, C. (2011). Flow cytometry and high-content imaging to identify markers of monocyte-macrophage differentiation. *BD Biosci*, 20.
51. Park, E. K., Jung, H. S., Yang, H. I., Yoo, M. C., Kim, C., & Kim, K. S. (2007). Optimized THP-1 differentiation is required for the detection.
52. Chanput, W., Mes, J. J., Savelkoul, H. F., & Wichers, H. J. (2013). Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds. *Food & function*, 4(2), 266-276.
53. Torres-Huerta, A., Villaseñor, T., Flores-Alcantar, A., Parada, C., Alemán-Navarro, E., Espitia, C., ... & Rosenstein, Y. (2017). Interaction of the CD43 sialomucin with the Mycobacterium tuberculosis Cpn60. 2 chaperonin leads to tumor necrosis factor alpha production. *Infection and immunity*, 85(3), e00915-16.
54. Plotnikova, M. A., Klotchenko, S. A., & Vasin, A. V. (2016). Development of a multiplex quantitative PCR assay for the analysis of human cytokine gene expression in influenza A virus-infected cells. *Journal of immunological methods*, 430, 51-55.
55. Wang, N., Satoskar, A., Faubion, W., Howie, D., Okamoto, S., Feske, S., ... & Terhorst, C. (2004). The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions. *Journal of Experimental Medicine*, 199(9), 1255-1264.
56. Raabe, T., Bukrinsky, M., & Currie, R. A. (1998). Relative contribution of transcription and translation to the induction of tumor necrosis factor- α by lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*, 273(2), 974-980.
57. Barthel, R., Tsytsykova, A. V., Barczak, A. K., Tsai, E. Y., Dascher, C. C., Brenner, M. B., & Goldfeld, A. E. (2003). Regulation of tumor necrosis factor alpha gene expression by mycobacteria involves the assembly of a unique enhanceosome dependent on the coactivator proteins CBP/p300. *Molecular and cellular biology*, 23(2), 526-533.
58. Parameswaran, N., & Patial, S. (2010). Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 20(2).
59. Falvo, J. V., Tsytsykova, A. V., & Goldfeld, A. E. (2010). Transcriptional control of the TNF gene. In *TNF Pathophysiology* (Vol. 11, pp. 27-60). Karger Publishers.

60. Luo, Y., & Zheng, S. G. (2016). Hall of fame among pro-inflammatory cytokines: interleukin-6 gene and its transcriptional regulation mechanisms. *Frontiers in immunology*, 7, 604.
61. Ozato, K., Tsujimura, H., & Tamura, T. (2002). Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the immune system. *Biotechniques*, 33, S66-S75.
62. Hiscott, J., Marois, J., Garoufalidis, J., D'addario, M., Roulston, A., Kwan, I., ... & Bensi, G. (1993). Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Molecular and cellular biology*, 13(10), 6231-6240.
63. Marecki, S., Riendeau, C. J., Liang, M. D., & Fenton, M. J. (2001). PU. 1 and multiple IFN regulatory factor proteins synergize to mediate transcriptional activation of the human IL-1 β gene. *The Journal of Immunology*, 166(11), 6829-6838.
64. Banuls, A. L., Sanou, A., Van Anh, N. T., & Godreuil, S. (2015). Mycobacterium tuberculosis: ecology and evolution of a human bacterium. *Journal of medical microbiology*, 64(11), 1261-1269.4
65. Hossain, M., & Norazmi, M. N. (2013). Pattern recognition receptors and cytokines in Mycobacterium tuberculosis infection—the double-edged sword?. *BioMed research international*, 2013.
66. Kaufmann, S. H. (2002). Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Annals of the rheumatic diseases*, 61(suppl 2), ii54-ii58.
67. Leifer, C. A., & Medvedev, A. E. (2016). Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. *Journal of leukocyte biology*, 100(5), 927-941.
68. Vidya, M. K., Kumar, V. G., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., & Bhatta, R. (2018). Toll-like receptors: significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *International Reviews of Immunology*, 37(1), 20-36.
69. Kawai, T., & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death & Differentiation*, 13(5), 816-825.
70. Gay, N. J., Symmons, M. F., Gangloff, M., & Bryant, C. E. (2014). Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nature Reviews Immunology*, 14(8), 546-558.
71. Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L. A., Netea, M. G., & Van Crevel, R. (2011). Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011.

72. Proell, M., Riedl, S. J., Fritz, J. H., Rojas, A. M., & Schwarzenbacher, R. (2008). The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences. *PloS one*, 3(4).
73. Shaw, M. H., Reimer, T., Kim, Y. G., & Nuñez, G. (2008). NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors. *Current opinion in immunology*, 20(4), 377-382.
74. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). *Cellular and molecular immunology E-book*. Elsevier Health Sciences.
75. Ferwerda, G., Girardin, S. E., Kullberg, B. J., Le Bourhis, L., De Jong, D. J., Langenberg, D. M., ... & Netea, M. G. (2005). NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS pathogens*, 1(3).
76. Gandotra, S., Jang, S., Murray, P. J., Salgame, P., & Ehrt, S. (2007). Nucleotide-binding oligomerization domain protein 2-deficient mice control infection with Mycobacterium tuberculosis. *Infection and immunity*, 75(11), 5127-5134.
77. Brown, G. D. (2006). Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature Reviews Immunology*, 6(1), 33.
78. Dinadayala, P., Lemassu, A., Granovski, P., Cérantola, S., Winter, N., & Daffé, M. (2004). Revisiting the Structure of the Anti-neoplastic Glucans of Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guérin STRUCTURAL ANALYSIS OF THE EXTRACELLULAR AND BOILING WATER EXTRACT-DERIVED GLUCANS OF THE VACCINE SUBSTRAINS. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 12369-12378.
79. Yadav, M., & Schorey, J. S. (2006). The β -glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood*, 108(9), 3168-3175.
80. Yurchenko, M., Skjesol, A., Ryan, L., Richard, G. M., Kandasamy, R. K., Wang, N., ... & Espevik, T. (2018). SLAMF1 is required for TLR4-mediated TRAM-TRIF-dependent signaling in human macrophages. *Journal of Cell Biology*, 217(4), 1411-1429.
81. Heim, V. J., Stafford, C. A., & Nachbur, U. (2019). NOD Signaling and Cell Death. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7.
82. Nickel, W. (2003). The mystery of nonclassical protein secretion: a current view on cargo proteins and potential export routes. *European Journal of Biochemistry*, 270(10), 2109-2119.
83. Wajant, H., Pfizenmaier, K., & Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death & Differentiation*, 10(1), 45-65.

84. Horiuchi, T., H. Mitoma, S.-i. Harashima, H. Tsukamoto, y T. Shimoda. «Transmembrane TNF-: Structure, Function and Interaction with Anti-TNF Agents». *Rheumatology* 49, n.º 7 (1 de julio de 2010): 1215-28.
85. Lieu, Z. Z. *et al.* A trans-Golgi network golgin is required for the regulated secretion of TNF in activated macrophages in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 3351–3356 (2008).
86. Stow, J. L., Manderson, A. P. & Murray, R. Z. SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system. *Nature Reviews Immunology* **6**, 919–929 (2006)
87. Stow, J. L., & Murray, R. Z. (2013). Intracellular trafficking and secretion of inflammatory cytokines. *Cytokine & growth factor reviews*, 24(3), 227-239
88. Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine & growth factor reviews*, 22(4), 189-195.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 27 de julio de 2020.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“Influencia de la de la proteína adaptadora EAT-2 en la secreción de citocinas inflamatorias en un modelo de macrófagos humanos”**, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Magda Karina Espíndola Martínez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dr. Luis Enrique A. Cañedo Dorantes



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LUIS ENRIQUE ALBERTO CAÑEDO Y DORANTES | Fecha:2020-08-12 18:10:37 | Firmante

lJzESxoTOhx8iFohmohqXNNaPuNkPX5WKtTe7ARSBZvTw4l5ZueziUaRvre02G2PWGwizpK3DnYEXI9Siclwgzcl9bubMVVdHoU9NNv7xaoZuStc2MTIIWTIb6ihT0cH7NaUDQ
qeSs2uF13yBk7R1Wt9EhnGEybwztYl3sjUjMRLjmXtuLoo8q9haPM7ZKwGtcuP5K5QRcy7uRd2lcZPtDgtixMK2o0my/Ua06vJvtdoD2dGx6QFiT37qJyC+T69SDfvCKPgW5Bp1O2
POijTEeYjs+a80nDZWfn/AoRie4v470pTj9AgHHSbQhi/RHZI7VpmYwuD/zY+QpQF+A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[mOX7Gn](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/AnN3D3uJicmPX5yLgNOqZvH9Z4JBjHM>



Cuernavaca, Mor., 27 de julio de 2020.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“Influencia de la de la proteína adaptadora EAT-2 en la secreción de citocinas inflamatorias en un modelo de macrófagos humanos”**, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Magda Karina Espíndola Martínez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha:2020-08-07 00:20:50 | Firmante

kl7j+MWDDmqI0XTolo1WLNp8kv/twWB2fCiEScKzcGFJML9wF4i1FoFQGcnPfJvwUkHYjMOMRL/YGkxo+ncbs3r4suSDylICcPOEoW+8uNgQQuwZOinTA714oSp3YwJumQ3N1YsDFw6lVMYaMUJ4P+dRXQAVq2StGYzFku7rFib2mpsdQGHF3mktW2l/jvTup+2qLzB5aEJshBjlgMS9XrD7ktAYWOTt7atANjkbzZNCZ2sXQ4xe0yBNtAcJDP1noSW9ZuK64X2auxucgl9m/IF5sViCvDk9O0ml2530dCSnRgrSqJGmcPtUHD9plerYuHjFu6UN8WroKcXg9HPF4w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[HVxuDE](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/hiqxNzMwPxiBvZFC87ZGuZf1Uanho15j>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 27 de julio de 2020.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“Influencia de la de la proteína adaptadora EAT-2 en la secreción de citocinas inflamatorias en un modelo de macrófagos humanos”**, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Magda Karina Espíndola Martínez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Jesús Santa Olalla Tapia



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JESUS SANTA OLALLA TAPIA | Fecha:2020-08-07 00:31:41 | Firmante

xgjYENeFdfrrPt56RsObVkgTFbNMn6nOOV+ziR3kX0rjAjEG1D6suBillBkyiv4A6bshsbZfVY1hScItnAJtpBNxriAHw/b76hMAz0fK4zSejoUeAjqCzEUekiumEAnDYFjsJRqPheFf+ENfP3Oop8e0rX5RxX2gKrmXjuW8iGKPwKUWybRXwyn+7YcmSxOZ4UIS0xsBQjd7XiFQ3d+8l7kzcK0DQ9YZ3IFu+qksQnVXszxV6V83c901N7dVqumNY6jDKmI9LjFdVS08iMn1s3bKultK5pENevKRgcvhVIE6oaPOR6Mq3IFDagwjyrHGRGaFBNnJonJwZl3RpxA/64Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



AR6pwt

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/kxRgb3UcCywcy7Y88BQzMxfrJmcV9UQp>



Cuernavaca, Mor., 27 de julio de 2020.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“Influencia de la de la proteína adaptadora EAT-2 en la secreción de citocinas inflamatorias en un modelo de macrófagos humanos”**, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Magda Karina Espíndola Martínez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Judith González Christen



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUDITH GONZALEZ CHRISTEN | Fecha:2020-08-07 10:14:18 | Firmante

EuJBsi7zv16Zsdt9LdukUJAxVTjabcha7fTjDm7gCu4wVwclZfxVqLhRLsNcif/lxfOXCeU4oWQtL/yy/nf0B/MiZt5IRb2ubsl7e14/XXfTyLmPlbniPHEWCHLSMTRmN7Bfw1sjcUGVzmx5A3vZwR3RfnfrtZtkzJN88LdSGhWdLGbi+c1ly84UxUSBPqeZ3izw+3KYSFqHXiSBgvTcNmXy+TnZbhRTKxCbYCOfdDj3NnevbuCYM14OCsPilavBSmAqleaSIQJxxwE0TacSwkVm3S+9hczQPS7u1qeQ2Yze7RKmvVL6U13t5utH5Xt8zCquUX6Er3b5wWgqVPGQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



DeNAnC

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/IOugF5PhuhME6VfAhBqfC3p8zwwKws3F>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 27 de julio de 2020.

Dra. Vera Lucia Petricevich

Directora

Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“Influencia de la de la proteína adaptadora EAT-2 en la secreción de citocinas inflamatorias en un modelo de macrófagos humanos”**, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Magda Karina Espíndola Martínez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dra. María Angélica Santana Calderón



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2020-08-07 09:51:32 | Firmante

RZFI60kbsrh+c0Ui+4b7LQij36RkYn9nd9ZnFx62KlfwXEvo0p6jQDndnsX5SDdxriWQNHETA GD60pT0MCFzLAdhosZYjTG+dpKFM1BRe54QoFv8XxRvI3PucT7qsxpmxdwuXErnziX0CdQSiLr9PQF3cGL69WzLNHsbwCQ9/8gil7BX4nuwYhUTJK7elhhx4ZawNZRuceRXijoNm9h75P1kCH01Ule90zIB1juKS7hHYxYFwqbSuu2LusiUDk/phb7AHpWfVFN3mO+TN3Wrd+BXQI+IYGIV+JtMtZzKlcMylhICspbseAONIJSNPcVdFs3YRp3ZlxcZUr5OU4aTiQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



eQZ2uX

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/5IROmpduR3nHZAGc4eDyrl4FJXyf3DfQ>

