



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA,
MICROBIOLOGÍA, MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD
PÚBLICA Y MEDICINA LEGAL Y FORENSE

TESIS DOCTORAL:

**PAPEL DE FAST (*Fas-activated serine
threonine phosphoprotein*) EN LA
FAGOCITOSIS DE LAS BACTERIAS POR
PARTE DE LOS MACRÓFAGOS**

Presentada por Lisbeth Gonçalves De Freitas para
optar al grado de

Doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dra. María Simarro Grande

Dr. Antonio Orduña Domingo

Dr. Miguel Ángel Bratos Pérez

**PAPEL DE FAST (*Fas-activated serine
threonine phosphoprotein*) EN LA
FAGOCITOSIS DE LAS BACTERIAS POR
PARTE DE LOS MACRÓFAGOS**

LISBETH GONÇALVES DE FREITAS

DIRECTORES: DRA. MARÍA SIMARRO GRANDE
DR. ANTONIO ORDUÑA DOMINGO
DR. MIGUEL ANGEL BRATOS PÉREZ

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL
GRADO DE DOCTORA EN LA UNIVERSIDAD DE
VALLADOLID

VALLADOLID, FEBRERO DE 2016

A Mauricio Jorge, Rosa Isabel y Lisbeth Sofía son el motor de mi vida

A mis padres Joao y Rosa María son los pilares de mi existencia

A mis abuelos Joao Bento e Isabel son la alegría de mi corazón

A mis suegros Angel y Zoila que son ejemplos para mi vida

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Hay momentos especiales en la vida en la que debemos detenernos y dar gracias, éste es uno de esos momentos.

A Dios, por ser el amigo que nunca falla, la luz que guía el sendero y el regazo en los sufrimientos.

A la Universidad de Valladolid por permitirme recibir una formación profesional de calidad.

Gracias al departamento de Anatomía Patológica, Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública y Medicina Legal y Forense por conceder la plataforma científica y técnica sobre la que se pudo desarrollar los experimentos y los nuevos conocimientos científicos plasmados en esta Tesis Doctoral. En especial a Raquel y Rebeca por todo su apoyo.

Al Hospital Clínico Universitario de Valladolid por ser la cuna de mi formación como especialista en Microbiología y Parasitología.

Muchas gracias al servicio de Microbiología e Inmunología del Hospital Clínico Universitario; constituyen un equipo profesional y científico de alto nivel, dirigido por el Dr. Raul Ortiz de Lejarazu. Mis respetos y admiración: Dra. Nocito, Dra. Rojo, Dra. Tejero, Dra. Gobernado, Dra. Merino, Dra. Alvarez, Dra. Barrio, Dra. Nogueira. A su personal técnico y de enfermería dirigido por Ana Montoya. Son dignos ejemplos a seguir y espero seguir contando con vuestro apoyo y guía.

A la Dra. María Simarro Grande quien constituye la piedra angular de esta Tesis, por su esmero, dedicación, esfuerzo, paciencia y perfección. En todo momento ha facilitado los conocimientos, experiencia y apoyo necesarios para la elaboración de la Tesis Doctoral.

Al Dr. Antonio Orduña Domingo por ser el primero en abrirme las puertas hacia la investigación y por apoyarme en este difícil camino.

Al Dr. Miguel Ángel Bratos Pérez cuyos consejos iluminan mis pasos a seguir: la planificación, el estudio, el orden durante el trabajo y el esfuerzo diario dan frutos en abundancia.

A mi amado esposo Mauricio por seguir siendo la persona perfecta que siempre esta allí. ¡Gracias por lo sueños, proyectos y realidades alcanzados! y a nuestras hijas Rosa Isabel y Lisbeth Sofía, gracias por todos vuestros sacrificios, cariño y felicidad. Como dice Benjamin Franklin: “La felicidad humana generalmente no se logra con grandes golpes de suerte, que pueden ocurrir pocas veces, sino con pequeñas cosas que ocurren todos los días”.

A mis padres Rosa y Joao, a mis suegros Zoila y Angel, a mis hermanos: Mariela, Gabriel y sus bellos hijos (Vanessa Alejandra, Miguelangel Gabriel y Silvia Mariela), Eduardo y su hija Mariangel. To my brother Juan Jose. You can do it. Gracias por acompañarme y cuidarme con esmero. Todo lo sembrado ayer, es cosechado hoy. A mis adorados abuelos Joao Bento e Isabel.

Como dijo Unai Emery en una rueda de prensa: “El éxito no está en el final sino en el camino”.

Muchas gracias a todos aquellos que han participado directa o indirectamente.

Valladolid, febrero 2016

PRESENTACIÓN

PRESENTACIÓN

Esta Tesis Doctoral estudia los efectos de la ausencia de FAST (*Fas-activated serine threonine phosphoprotein*) en la capacidad fagocítica de los macrófagos en animales de experimentación y humanos. Recientemente, se ha avanzado mucho en la comprensión de las bases moleculares y funciones celulares de FAST y sus homólogos. La generación de ratones deficientes en FAST (KO) nos ha permitido descubrir la importancia de esta proteína en la regulación de diversos aspectos de la respuesta inmune. En un modelo de daño pulmonar agudo por lipopolisacáridos, los ratones que carecían de FAST mostraron una reducción en la infiltración de neutrófilos y las concentraciones de citocinas y quimiocinas en el lavado broncoalveolar. El análisis de quimeras de médula ósea sugería que las células responsables del fenotipo eran células residentes en pulmón de origen hematopoyético. Nuestros estudios posteriores demostraron que la población macrofágica alveolar de los ratones FAST KO participaba en el fenotipo inflamatorio de los mismos. El propósito del presente estudio fue explorar los efectos de la deficiencia de FAST en otros aspectos del sistema inmune innato, particularmente en algunas funciones macrofágicas tales como fagocitosis y muerte intracelular de bacterias gram positivas y gram negativas.

Nuestros resultados muestran que los macrófagos deficientes en FAST tienen una capacidad aumentada de fagocitar bacterias *Escherichia coli* en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Los macrófagos KO también presentaron un ligero aumento de la fagocitosis de *Staphylococcus aureus* pero no resultó ser significativo. La evaluación de la expresión de los receptores TLR2 y TLR4 y de diferentes marcadores de maduración no reveló diferencias significativas entre macrófagos de ratones *wild type* (WT) y ratones KO. Finalmente, ambos grupos de macrófagos presentaron una capacidad similar de matar bacterias y de producir especies reactivas de oxígeno. Los conteos bacterianos a tiempos iniciales en el ensayo de protección con gentamicina se correlacionaron con los índices fagocíticos. Finalmente, demostramos que los macrófagos derivados de la línea monocítica humana THP-1 en los que se silenció la expresión de FAST mediante RNA de interferencia también presentó una capacidad aumentada de fagocitar bacterias *Escherichia coli*. En conclusión, nuestros resultados revelan un nuevo papel de FAST en la regulación de la fagocitosis.

El desarrollo del presente proyecto está incluido en la línea de investigación básica sobre FAST y sus homólogos que se está desarrollando en la facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid dirigida por la Dra. María Simarro Grande.

TABLA DE CONTENIDO

Tabla de contenido

<u>LISTA DE FIGURAS.....</u>	<u>12</u>
<u>LISTA DE TABLAS.....</u>	<u>15</u>
<u>LISTA DE ABREVIATURAS CON SÍMBOLOS OFICIALES HGNC Y MGI.....</u>	<u>17</u>
<u>LISTA DE ABREVIATURAS.....</u>	<u>22</u>
<u>INTRODUCCIÓN.....</u>	<u>27</u>
EL SISTEMA INMUNITARIO.....	28
INMUNIDAD INNATA	28
INMUNIDAD ADAPTATIVA	28
COMPONENTES CELULARES DEL SISTEMA INMUNITARIO.....	29
MACRÓFAGOS.....	29
LOS MACRÓFAGOS COMO CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO.....	29
COORDINACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA.....	30
SECRECIÓN DE CITOCINAS	30
FAGOCITOSIS Y ENDOCITOSIS	31
MECANISMOS MICROBICIDAS PRESENTES EN FAGOSOMAS Y FAGOLISOSOMAS	32
ROS Y RNS.....	33
RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATÓGENOS EN MACRÓFAGOS Y SUS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN	35
RECEPTORES OPSÓNICOS Y OPSONINAS.....	35
RECEPTORES Y FAGOCITOSIS DE MICROORGANISMOS	43
CITOESQUELETO Y MODELOS DE FAGOCITOSIS EN LOS MACRÓFAGOS.....	44
MECANISMOS DE CONTROL DE LA FAGOCITOSIS EN LOS MACRÓFAGOS.....	48
EVALUACIÓN DE LA FAGOCITOSIS: <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	48
GENERACIÓN DE MACRÓFAGOS	50
FENOTIPOS DE LOS MACRÓFAGOS	51
FAMILIA DE PROTEÍNAS FAST (FAS-ACTIVATED SERINE THREONINE PHOSPHOPROTEIN)	53
FAST	56
FASTKD1.....	61
FASTKD2.....	62
FASTKD3.....	63
FASTKD4.....	63
FASTKD5.....	64
<u>OBJETIVOS.....</u>	<u>65</u>

MATERIAL Y MÉTODOS..... 67

ANIMALES	68
GENERACIÓN DE RATONES C57BL/6 DEFICIENTES EN LA PROTEÍNA FAST	68
GENOTIPADO DE LOS RATONES	69
CEPAS DE BACTERIAS	70
OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS PERITONEALES	70
DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS HUMANOS A MACRÓFAGOS	70
SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE RNA DE INTERFERENCIA	71
ENSAYO DE FAGOCITOSIS	72
ENSAYO DE FAGOCITOSIS <i>IN VITRO</i> :.....	73
ENSAYO DE FAGOCITOSIS <i>IN VIVO</i> :	74
ENSAYO DE PROTECCIÓN CON GENTAMICINA	74
ENSAYO DE MADUREZ CELULAR	75
ENSAYO DE PRODUCCIÓN DE ROS	75
EVALUACIÓN POR REAL TIME PCR DEL SILENCIAMIENTO DE FAST MEDIANTE SIRNA 76	
EVALUACIÓN POR WESTERN BLOT DEL SILENCIAMIENTO DE FAST MEDIANTE SIRNA . 78	
ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y GRÁFICOS	81

RESULTADOS..... 82

AUSENCIA DE FAST PROVOCA INCREMENTO DE LA FAGOCITOSIS EN MACRÓFAGOS PERITONEALES	83
LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LOS MACRÓFAGOS ES INDEPENDIENTE DE FAST	85
LOS MACRÓFAGOS KO TIENEN AUMENTADO EL CONTENIDO DE LA PROTEÍNA F-ACTINA DURANTE LA FAGOCITOSIS	86
LA AUSENCIA DE FAST TAMBIÉN PROVOCA INCREMENTO DE LA FAGOCITOSIS EN MACRÓFAGOS PERITONEALES <i>IN VIVO</i>	88
PAPEL DE FAST EN LA CAPACIDAD FAGOCÍTICA DE LOS MACRÓFAGOS HUMANOS	89

DISCUSIÓN..... 93

AUSENCIA DE FAST Y FAGOCITOSIS EN MACROFAGOS MURINOS Y HUMANOS	94
OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS MURINOS PARA FAGOCITOSIS <i>IN VITRO</i>	95
OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS HUMANOS A PARTIR DE THP-1	95
FAGOCITOSIS <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i>	96
EXPRESIÓN DE RECEPTORES TLR2 Y TLR4.....	96
MADURACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS	97
FAGOCITOSIS DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS	98
FAST Y ACTIVIDAD BACTERICIDA	101
CONTENIDO DE F-ACTINA EN LA FAGOCITOSIS	102
<i>SPLICING</i> ALTERNATIVO, FAST Y FAGOCITOSIS	103

RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL, FAST Y FAGOCITOSIS	103
FAST, MIEMBROS DE LA FAMILIA FASTKD, RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL Y METABOLISMO DEL RNA MITOCONDRIAL.....	110
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>122</u>
<u>SUGERENCIAS</u>	<u>124</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>126</u>
<u>ANEXOS</u>	<u>136</u>
ANEXO A-1	137
ANEXO A-2	138
ANEXO A-3	140
ANEXO A 4.....	147

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: MADURACIÓN DE LOS FAGOSOMAS EN LOS MACRÓFAGOS.....	32
FIGURA 2: MECANISMOS MICROBICIDAS PRESENTES EN FAGOSOMAS Y FAGOLISOSOMAS ...	33
FIGURA 3: SEÑALES INTRACELULARES DE LOS RECEPTORES TLR EN LOS MACRÓFAGOS.....	38
FIGURA 4: INTERACCIÓN ENTRE TLR4 Y LY96 PARA IDENTIFICAR MICROORGANISMOS EN LOS MACRÓFAGOS	39
FIGURA 5: RECEPTORES CITOSÓLICOS Y SUS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN.	41
FIGURA 6: MIEMBROS DE LA FAMILIA NLR EN HUMANOS Y RATONES.	42
FIGURA 7: VÍAS DE ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3.....	43
FIGURA 8: RECEPTORES OPSÓNICOS Y NO OPSÓNICOS EN LOS MACRÓFAGOS.....	44
FIGURA 9: FORMACIÓN DE FILAMENTOS DE ACTINA.	46
FIGURA 10: MODELO DE FAGOCITOSIS MACROFÁGICA DE <i>E. COLI</i>	47
FIGURA 11: MODELO DE FAGOCITOSIS EN MACRÓFAGOS DE PARTÍCULAS INERTES.....	48
FIGURA 12: FENOTIPOS DE MACRÓFAGOS.	53
FIGURA 13: ESTRUCTURA PRIMARIA DE LAS PROTEÍNAS FAST Y FASTKD1-5.	54
FIGURA 14: LOCALIZACIÓN CELULAR DE LAS PROTEÍNAS FASTKD1-5	55
FIGURA 15: DISTRIBUCIÓN TISULAR DE LOS GENES DE FASTKD1-5 EN HUMANOS Y RATONES.	55
FIGURA 16: ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA FUNCIÓN DE FAST EN LOS GRÁNULOS DE ESTRÉS CITOPASMÁTICOS.	57
FIGURA 17: ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA PARTICIPACIÓN DE FAST EN EL NÚCLEO PARA REGULAR EL SPLICING ALTERNATIVO.....	58
FIGURA 18: INFLAMACIÓN PULMONAR EN RATONES WT Y FAST KO TRATADOS CON LPS.....	59
FIGURA 19: NIVELES DE CITOCINAS Y QUIMIOATRAYENTES EN EL LAVADO BRONCOALVEOLAR DE RATONES WT Y FAST KO.....	60
FIGURA 20: EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE UN MODELO MURINO DE ARTRITIS.....	61
FIGURA 21: CARACTERÍSTICAS GÉNICAS DE FASTKD2	62
FIGURA 22: GENERACIÓN DE RATONES FAST KO.....	69
FIGURA 23: GENOTIPADO DE LOS RATONES.	70
FIGURA 24: FAGOCITOSIS DE <i>E. COLI</i> DH5-A, <i>E. COLI</i> BL21, <i>S. AUREUS</i> COWAN 1 Y PARTÍCULAS DE LATEX EN MACRÓFAGOS WT Y KO.....	83
FIGURA 25: FAGOCITOSIS DE <i>E. COLI</i> DH5-A Y <i>S. AUREUS</i> COWAN 1 EN MACRÓFAGOS WT Y KO.....	84
FIGURA 26: SUPERVIVENCIA DE <i>E. COLI</i> DH5-A, <i>E. COLI</i> BL21 Y <i>S. AUREUS</i> COWAN 1 DENTRO DE LOS MACRÓFAGOS KO Y WT.....	86
FIGURA 27: CITOMETRÍA DE FLUJO DE LA EXPRESIÓN DE TLR2, TLR4 Y EL CONTENIDO DE F-ACTINA.	87
FIGURA 28: CITOMETRÍA DE FLUJO DE LOS MARCADORES DE SUPERFICIE CELULAR EN LOS MACRÓFAGOS WT Y KO.	88
FIGURA 29: FAGOCITOSIS DE <i>E. COLI</i> POR MACRÓFAGOS PERITONEALES <i>IN VIVO</i>	89
FIGURA 30: DIFERENCIACIÓN DE THP-1 HUMANO EN MACRÓFAGOS USANDO PMA.....	89

FIGURA 31: NIVELES RELATIVOS DE MRNA DE FAST EN MACRÓFAGOS HUMANOS TRANSFECTADOS CON siRNA.....	90
FIGURA 32: ANÁLISIS DE TRANSFERENCIA DE WESTERN BLOT DE EXTRACTO DE PROTEÍNAS DE MACRÓFAGOS HUMANOS TRANSFECTADOS CON siRNA#1.....	91
FIGURA 33: FAGOCITOSIS DE <i>E. COLI</i> DH5-A Y <i>E. COLI</i> BL21 EN MACRÓFAGOS HUMANOS CON SILENCIAMIENTO DE FAST.....	92
FIGURA 34: FIGURA REPRESENTATIVA DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y ESTRUCTURALES DE LAS BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS.....	99
FIGURA 35: MICROFOTOGRAFÍA ELECTRÓNICA DE UNA MITOCONDRIA EN UN MICROSCOPIO DE TRANSMISIÓN.....	104
FIGURA 36: MAPA DEL DNA MITOCONDRIAL HUMANO.....	105
FIGURA 37: LOCALIZACIÓN EN LA CADENA PESADA Y LIGERA DE LOS TRANSCRITOS DEL DNA MITOCONDRIAL HUMANO.....	105
FIGURA 38: GLUCOLISIS.....	106
FIGURA 39: CICLO DEL ÁCIDO CÍTRICO (CICLO DE KREB).....	107
FIGURA 40: CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES Y TRANSPORTE DE PROTONES A TRAVÉS DE LOS COMPLEJOS MITOCONDRIALES.....	108
FIGURA 41: FAST ES UNA PROTEÍNA MITOCONDRIAL.....	109
FIGURA 42: FAST ES UNA PROTEÍNA MITOCONDRIAL.....	110
FIGURA 43: FUNCIONES RESPIRATORIAS DE CÉLULAS <i>KNOCKDOWN</i> DE FASTKD3..	112
FIGURA 44: DEFICIENCIA DEL COMPLEJO I DE LOS MACRÓFAGOS <i>KO</i>	113
FIGURA 45: FAST ES NECESARIO PARA LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL..	114
FIGURA 46: PARTICIPACIÓN DE FAST EN LA GENERACIÓN DE LA FORMA MADURA DEL MRNA DE ND6.....	115
FIGURA 47: FAST REGULA LA EXPRESIÓN DE MRNA DE ND6 EN LA MITOCONDRIA.....	116
FIGURA 48: CONTENIDO RELATIVO DE MT-MRNA EN CÉLULAS HEK293T.....	117
FIGURA 49: CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE MTDNA EN CELULAS <i>KNOCKDOWN</i> DE shFASTKD4.....	117
FIGURA 50: FRACCIÓN DEL RNA QUE PERMANECE DESPUÉS DE LA INHIBICIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN CON BROMURO DE ETIDIO (ETBR).....	118
FIGURA 51: WESTERN BLOT REPRESENTATIVO DE LA PRESENCIA DE FASTKD4, OXA1L, COX2 Y CICLOFILINA D EN MITOCONDRIAS.....	118
FIGURA 52: CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE PRECURSORES DE MRNA MITOCONDRIALES EN CÉLULAS CON FASTKD5 SILENCIADO.....	119

LISTA DE TABLAS

LISTA DE TABLAS

TABLA 1: CITOCINAS PRODUCIDAS POR LOS MACRÓFAGOS, RECEPTORES EN LAS CÉLULAS DIANAS Y SUS FUNCIONES BIOLÓGICAS.....	30
TABLA 2: ESPECIES REACTIVAS DERIVADAS DEL OXÍGENO Y DEL NITRÓGENO.	34
TABLA 3: POTENCIA DE LA UNIÓN BACTERIA-FAGOCITO MEDIADA POR OPSONINAS.	35
TABLA 4: RECEPTORES TLR DE LOS MACRÓFAGOS Y SUS LIGANDOS.....	37
TABLA 5: LOCALIZACIÓN DE LOS GENES DE CADA MIEMBRO DE LA FAMILIA FAST EN LOS CROMOSOMAS DE LA ESPECIE <i>HOMO SAPIENS</i>	56
TABLA 6: ANTICUERPOS CONJUGADOS UTILIZADOS EN EL ENSAYO DE MADUREZ CELULAR.	75
TABLA 7: POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL EN MACRÓFAGOS WT Y KO.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS CON SÍMBOLOS OFICIALES HGNC Y MGI

LISTA DE ABREVIATURAS CON SÍMBOLOS OFICIALES HGNC y MGI

Símbolo oficial	Descripción	Otros símbolos comunes
APCS	Amyloid P component, serum	SAP
Arg1	Arginase 1	
BCL-2	B-cell CLL/lymphoma 2	
BCL2L2	BCL2-like 2	
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	
C3	Complement component 3	
CARD	Caspase-recruitment domain	
CARD9	Caspase recruitment domain family, member 9	
CCL1	Chemokine (C-C motif) ligand 1	
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	MCP-1
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	RANTES
CCR2	Chemokine (C-C motif) receptor 2	
CCR3	Chemokine (C-C motif) receptor 3	
CD1A	CD1a molecule	
CD1B	CD1b molecule	
CD14	CD14 molecule	
CD33	CD33 Molecule	SIGLEC-3
CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	
CD80	CD80 molecule	
CD163	CD163 molecule	
CD207	CD207 molecule, langerin	CLEC4K
CD209	CD209 molecule	DC-SIGN
CDC42	cell division cycle 42	
Chil3	chitinase-like 3	Ym1
CLEC4A	C-type lectin domain family 4, member A	DCIR
CLEC4E	C-type lectin domain family 4, member E	Mincle
CLEC6A	C-type lectin domain family 6, member A	Dectin-2
CLEC7A	C-type lectin domain family 7, member A	Dectin-1
CR1	Complement component (3b/4b) receptor 1	
CSF1	colony stimulating factor 1	M-CSF
CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor	CD115
CSF2	colony stimulating factor 2	GM-CSF
CSF3	colony stimulating factor 3	G-CSF
CSF3R	Colony stimulating factor 3 receptor	CD114

CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	MIP-2
CXCL3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	
CXCL8	chemokine (C-X-C motif) ligand 8	IL-8
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	
CXCR1	chemokine (C-X-C motif) receptor 1	
CXCR5	chemokine (C-X-C motif) receptor 5	
DDX28	DEAD-box helicase 28	
DEF6	Differentially expressed in FDCP 6	SLAT
DHX30	DEAH-box helicase 30	
EGFR	Epidermal growth factor receptor	
FASTK	Fas-activated serine threonine kinase	FAST
FASTKD1	FAST kinase domains 1	
FASTKD2	FAST kinase domains 2	
FASTKD3	FAST kinase domains 3	
FASTKD4	FAST kinase domains 4	TBRG4
FASTKD5	FAST kinase domains 5	
FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2	
GRSF1	G-rich RNA sequence binding factor 1	
HIF1A	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	HIF - 1 α , HIF-1A
HMGB1	High-mobility group box 1	
HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	
HSP90B1	Heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	HSPgp96
HSPA4	Heat shock 70kDa protein 4	HSP70
HSPD1	Heat shock 60kDa protein 1	HSP60
IFIH1	Interferon induced with helicase C domain 1	MDA-5
IFNA1	interferon, alpha 1	
IFNAR1	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1	
IFNAR2	interferon (alpha, beta and omega) receptor 2	
IFNG	Interferon, gamma	IFN- γ
IL1B	Interleukin 1, beta	IL-1
IL1R1	Interleukin 1 receptor, type I	IL-1R1, CD121a, IL1RA
IL1R2	Interleukin 1 receptor, type II	IL-1R2, CD121b
IL1RAP	Interleukin 1 receptor accessory protein	IL-1RAP
IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	
IL2RB	Interleukin 2 receptor, beta	IL-2R β , CD122
IL2RG	interleukin 2 receptor subunit gamma	CD132
IL4	interleukin 4	

IL6	Interleukin 6	IL-6
IL6R	interleukin 6 receptor	IL-6R, CD126
IL6ST	Interleukin 6 signal transducer	gp130, CD130
IL10	Interleukin 10	IL-10
IL10RA	Interleukin 10 receptor, alpha	IL-10R1, CD210
IL10RB	Interleukin 10 receptor, beta	IL-10R2, CD210B
IL12B	interleukin 12B	
IL12RB1	Interleukin 12 receptor, beta 1	IL-12R β 1, CD212
IL12RB2	Interleukin 12 receptor, beta 2	IL-12R β 2
IL15RA	Interleukin 15 receptor, alpha	IL-15R α
IL17A	interleukin 17A	
IL18R1	Interleukin 18 receptor 1	IL-18R1, CD218a
IL18RAP	Interleukin 18 receptor accessory	IL-18RAP, CD218b
IL20RA	Interleukin 20 receptor, alpha	IL-20R1
IL23A	Interleukin 23, alpha subunit p19	IL-23
IL23R	Interleukin 23 receptor	IL-23R
IL27RA	Interleukin 27 receptor, alpha	IL-27R α
IRF3	Interferon regulatory factor 3	
IRF7	Interferon regulatory factor 7	
ITGAM	Integrin alpha M	CD11b
KHDRBS1	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 1	Sam68
LBP	Lipopolysaccharide binding protein	LPS-BP
LY96	Lymphocyte antigen 96	MD-2
Lyn	Yamaguchi sarcoma viral (v-yes-1) oncogene homolog	
MAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3	
MAP3K2	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2	MEKK2
MAPK12	Mitogen-activated protein kinase 12	
MAPK13	Mitogen-activated protein kinase 13	
MARCO	Macrophage receptor with collagenous structure	
MAVS	mitochondrial antiviral signaling protein	IPS-1
MBL2	Mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble	
MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	
MFGE8	Milk fat globule-EGF factor 8 protein	
MMP9	Matrix metalloproteinase 9	
MRC1	Mannose receptor, C type 1	CD206
MSR1	Macrophage scavenger receptor A 1	SR-A I. SR-A II
MYD88	Myeloid differentiation primary response 88	
NMB1220	Stomatin/Mec-2 family	

NOD1	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	
NOS2	Nitric oxide synthase 2, inducible	iNOS
PLAU	Plasminogen activator, urokinase	
PTX3	Pentraxin 3	
Retnla	resistin like alpha	Fizz1
RIPK2	receptor-interacting serine-threonine kinase 2	RICK, RIP2
SCARB1	Scavenger receptor class B, member 1	SRB1
SF3B4	splicing factor 3b subunit 4	SAP49
SFTPA1	Surfactant protein A1	SP-A
SFTPD	Surfactant protein D	SP-D
SIRPA	Signal-regulatory-protein alpha	SIRP α
SLAMF7	SLAM family member 7	CD319
SLC11A1	Solute carrier family 11, member 1	NRAMP1
SYK	Spleen tyrosine kinase	Syk
TAB2	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2	
TBRG4	Transforming growth factor beta regulator 4	FASTKD4
TGFB1	Transforming growth factor, beta 1	
TIAL1	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1	TIAR (TIA related)
TICAM1	Toll-like receptor adaptor molecule 1	TRIF
TNF	Tumor necrosis factor	TNF- α
TNFAIP8	TNF alpha induced protein 8	
TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	TNFRSF1, CD120a
TNFRSF1B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	CD120b, TNFRSF2
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6, E3 ubiquitin protein ligase	
Ucp2	Uncoupling protein 2	
VDAC1	Voltage-dependent anion channel 1	
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

Símbolo	Descripción en Inglés	Descripción en Castellano
AP-1	Activator protein-1	Proteína activadora 1
APS	Ammonium persulfate	Persulfato de amonio
ARN	Ribonucleic acid	Ácido ribonucleico
Arp2/3	Actin related protein 2/3	Proteína relacionada con actina 2/3
ATP		Adenosintrifosfato
ATPasa		Enzimas capaces de hidrolizar el adenosin trifosfato
BIR	Baculoviral inhibition of apoptosis protein repeat	Dominio repetidos de las proteínas inhibidoras de la apoptosis de baculovirus
cDNA	Complementary DNA	ADN complementario
CEA	Carcinoembryonic antigen	Antígeno carcinoembrionario
CO₂	Carbon dioxide	Dioxido de carbono
CR	Complement receptor	Receptor del complemento
CR3	Complement receptor type 3	Receptor del complemento tipo 3
CR4	Complement receptor type 4	Receptor del complemento tipo 4
DAMP	Damage-associated molecular patterns	Patrón de daño molecular
DHE	Dihydroethidium	Dihidroetidio
DIF-1	DD1 Interacting Factor-1	Factor 1 de interacción con DD1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
dsRNA	Double-Stranded RNA	Doble cadena de ARN
ECL	Electrochemiluminescence	Electroquimioluminiscencia
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Ácido etildiaminotetraacético
ETBR	Ethidium bromide	Etidiobromida
FADH₂	Flavin adenine dinucleotide	Flavin Adenin dinucleótido
FCCP	Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenyl-hydrazone	Carbonil cianida -p-trifluorometoxifenil-hidrazona
FcR	Fc receptor	Receptor Fc
FIIND	Function to find domain	Dominio de función para hallar
FimH	Minor component of type 1 fimbriae	Componente menor de la fimbria tipo 1
FITC	Fluorescein isothiocyanate	Isotiocianato de fluoresceína
GBS-F	Group B Streptococcus factor	Factor del grupo B de

		estreptococos
GFP	Green fluorescent protein	Proteína verde fluorescente
GlcNAc	N-acetyl-D-glucosamine	N-acetil-D-glucosamina
GPI	Glycosylphosphatidylinositol	Glicosilfosfatidilinositol
GTP	Guanosine-5'-triphosphate	Trifosfato de guanosina
GTPasas		Trifosfatasas de guanosina
H₂O₂	Hydrogen peroxide	Peróxido de hidrógeno
HDM	House dust mite	Polvo de ácaros caseros
HEK293T	Human embryonic kidney 293T	Células 293T embrionaria de riñón humano
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee	Comite de Nomenclatura génica HUGO
HIV	Human immunodeficiency virus	Virus de Inmunodeficiencia Humana
hMITO	Human anti-mitochondrial antigen M2	Antígeno M2 anti-mitochondrial humana
HRP	Horseradish peroxidase	Peroxidasa de rábano picante
IAS1	Intronic activator sequence 1	Secuencia 1 del activador intrónico
iE-DAP	D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid	Ácido D- glutamil-meso-diaminopimelico
IgG		Inmunoglobulina G
IRAKs	IL-1 receptor-associated kinases	Receptor de IL-1 asociado a kinasas
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif	Motivo de activación basado en tirosina de inmunoreceptores
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs	Motivo de inhibición basado en tirosina de inmunoreceptores
KC	Keratinocyte chemoattractant	Keratinocito quimioatrayente
KO	knock-out	deficiente
LB	Luria-Bertani medium	Medio de Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolisacárido
LRR	Leucine-rich repeats	Repeticiones ricas en leucina
LSB	Laemmli Sample Buffer	Sólución de muestra Laemmli
LTA	Lipoteichoic acids	Ácido lipoteicoico
MAPK	Mitogen-activated protein kinases	Proteína de mitógeno activado kinasa
MBL	Mannose-binding lectin	Lectina de unión a Manosa
MDM	Monocyte-derived macrophages	Macrófagos derivados de monocitos
MDP	Muramyl-dipeptide	Muramil dipeptido
MEFs	mouse embryonic fibroblasts	Fibroblastos embrionarios de

		ratón
MGI	Mouse Genome Informatics	Genoma informatizado de ratón
MHC	Major histocompatibility complex	Complejo mayor de Histocompatibilidad
mRNA	Messenger ribonucleic acid	Ácido ribonucleico mensajero
MSCRAMM	Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules	Moléculas de adhesión a la matriz de reconocimiento de la superficie microbiana
mtDNA	Mitochondrial desoxyribonucleic acid	Ácido desoxiribonucleico mitocondrial
mt-mRNA	Mitochondrial messenger ribonucleic acid	Ácido ribonucleico mensajero mitocondrial
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-kB	Nuclear factor kappa B	Factor nuclear kB
NK	Natural killer	Asesina natural
NLR	NOD-like receptors	Receptor parecido a NOD
NO	Nitric oxide	Óxido nítrico
NOD	nucleotide binding oligomerization	Nucleótidos unidos por oligomerización
NOS	NO synthase	Óxido nítrico sintasa
NRIF3	Nuclear Receptor Interacting Factor-3	Receptor nuclear que interactúa con el factor 3
O₂		Oxígeno molecular
OXPHOS	Oxidative phosphorylation	Fosforilación oxidativa
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns	Patrón molecular de patógenos
PBS	Phosphate Buffered Saline	Solución salina de fosfato
PCR	Polymerase chain reaction	Reacción en cadena de la polimerasa
PI	Phagocytic index	Índice fagocítico
PIP3-Rac1	Phosphatidylinositol trisphosphate	Fosfatidilinositol trifosfato
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate	Forbol 12-miristato 14-acetato
PRR	Pattern recognition receptors	Receptores de patrones de reconocimiento
PYD	Pyrin domain	Dominio de pirina
qRT-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa
r.p.m.		Revoluciones por minuto
RAP	RNA-binding domain abundant in Apicomplexans	Dominio unido al ARN abundante en Apicomplexas

RIG-I	Retinoic acid-inducible gene I	Gen I inducible del ácido retinoico
RLH	RIG-I-like helicase	Helicasa similar a RIG-I
RNA	Ribonucleic acid	Ácido ribonucleico
RNS	Reactive nitrogen species	Radicales de nitrógeno
ROS	Reactive oxygen species	Radicales de oxígeno
RPMI medium	Roswell Park Memorial Institute	Medio creado por el Instituto en memoria de Roswell Park
rRNAs	Ribosomal RNA	ARN ribosomal
SDS	Sodium dodecyl sulfate	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	Gel de poliacrilamida para electrophoresis con dodecilsulfato de sodio
SEM	Standard error mean	Error estándar de la media
SFB		Suero fetal bovino
siRNA	Small interfering RNA	Pequeños ARN de interferencia
SNP	Single nucleotide polymorphism	Polimorfismo de un único nucleótido
ssRNA	Single-Stranded RNA	Cadena simple de ARN
TEMED	N,N,N,N-tetramethylethylenediamine	N,N,N,N-tetrametiletinediamina
TH1	T helper type 1	Respuesta T ayudadora tipo 1
TH2	T helper type 2	Respuesta T ayudadora tipo 2
THP-1	Human monocytic cell line	Línea celular monocítica humana
TIA-1	T cell intracellular Antigen-1	Antígeno 1 intracelular de las células T
TIR	Toll-interleukin 1 receptor	Receptor 1 de la interleukina tipo Toll
TLR	Toll-like receptor	Receptor tipo Toll
Tregs	T Regulatory cells	Células T reguladoras
Tris-HCl	Hydroxymethylaminomethane hydrochloride	Hidroximetilminometano hidroclorídico
TRITC	Tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate	Tetrametilrodamina -5-isoyiocianato
tRNAs	Transfer RNAs	ARN de transferencia
U2OS	Osteosarcoma cell line	Línea celular de osteosarcoma
UFC		Unidades formadoras de colonia
VD3	1,25-dihydroxyvitamin D3	1,25 dihidroxivitamina D3
W4/129S6 ES	Mouse Embryonics Stem Cells W4/129S6	Células madre embrionarias de ratón W4/129S6
WT	Wild type	Tipo salvaje
YFP	Yellow fluorescent protein	Proteína amarilla fluorescente

INTRODUCCIÓN

EL SISTEMA INMUNITARIO

El sistema inmunitario es aquel conjunto de estructuras y procesos biológicos que protege contra enfermedades identificando y eliminando microorganismos, células patógenas y cancerosas; y necesita distinguirlos de los tejidos sanos del organismo para funcionar correctamente (1). El sistema inmunitario ha ido evolucionando a lo largo de miles de años, desarrollando múltiples mecanismos que se interrelacionan en una red compleja y dinámica que se adquiere antes de nacer, madura y se consolida en los primeros años de vida. El sistema inmunitario comprende la inmunidad innata y adaptativa.

Inmunidad Innata

La **inmunidad innata o inespecífica** es filogenéticamente más antigua que la inmunidad adaptativa y está presente en organismos vertebrados e invertebrados (2). Está formada por un conjunto de estructuras y procesos biológicos que interactúan con los agentes en un primer contacto.

La inmunidad innata comprende **barreras físicas, químicas y biológicas** ubicadas en la piel, los epitelios de los tractos respiratorio, digestivo y genitourinario (3). Las barreras químicas están constituidas por diferentes moléculas solubles como las defensinas- β en la piel y el tracto respiratorio (4); o la lisozima y la fosfolipasa A en la saliva, las lágrimas y la leche materna (5-6). La barrera biológica está constituida por la microbiota comensal de los tractos genitourinario y gastrointestinal que compiten con las bacterias patógenas por alimento y espacio. Si esta primera línea defensiva es superada, se produce un foco infeccioso primario y la inmunidad innata desarrolla inmediatamente otro conjunto de mecanismos celulares y moléculas solubles. Entre los componentes celulares destacan: **neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células *natural killer* (NK), células dendríticas y mastocitos**. Entre los componentes solubles involucrados destacan: sistema de complemento, proteínas de fase aguda, e interferones α y β (3).

Inmunidad Adaptativa

La **inmunidad adaptativa o específica** es aquel conjunto de estructuras y procesos biológicos que interactúan con los agentes que han sido reconocidos previamente por el sistema inmunitario y generan un conjunto de acciones celulares y humorales específicas frente al estímulo antigénico.

La respuesta inmune adaptativa se puede estructurar en tres etapas:

1. **Reconocimiento del antígeno**, es decir, macromoléculas específicas que son predominantemente proteínas, péptidos y carbohidratos. Se lleva a cabo por las células presentadoras de antígenos.
2. **Período de latencia**, dura varios días, en los que los linfocitos específicos amplifican su número, a la vez que se diferencian en células efectoras.

3. **Respuesta efectora**, consiste en:

- Secreción de anticuerpos específicos o **inmunoglobulinas** por parte de los linfocitos B, es decir, son macromoléculas capaces de reconocer y unirse a los antígenos. Representa la inmunidad humoral.
- Desarrollo de actividad citolítica específica por parte de los linfocitos T citotóxicos.
- Liberación de factores que activan las células fagocíticas.
- Adquisición de memoria inmunitaria.

La inmunidad adaptativa está presente únicamente en organismos vertebrados y sus características principales son la especificidad, diversidad, memoria, expansión clonal, especialización, falta de reactividad frente a lo propio, contención y homeostasis(7).

Componentes celulares del sistema inmunitario

Las células que componen el sistema inmune se originan de células primordiales pluripotenciales de la médula ósea. Estas células maduran en dos linajes diferentes, el linfoide (linfocitos T y B y células NK) y el mieloide (leucocitos polimorfonucleares y monocito-macrófagos). Concretamente, en esta introducción, nos centraremos en los macrófagos, objeto de nuestro estudio en la presente tesis doctoral.

MACRÓFAGOS

Los macrófagos son los centinelas del sistema inmunitario en los tejidos y realizan diversas funciones importantes tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa (8). Los macrófagos son más grandes que los monocitos, debido a la presencia de un retículo endoplasmático rugoso muy desarrollado y la presencia de un alto número de mitocondrias; además se caracterizan por una vida media larga.

Los macrófagos son muy heterogéneos y se diferencian en función de las condiciones fisiológicas presentes en los tejidos, por ello han recibido diversos nombres según su ubicación, por ejemplo: células de Kupffer en el hígado, osteoclastos en los huesos, células microgliales en el tejido nervioso, macrófagos alveolares en el pulmón entre otros (8).

Las funciones de los macrófagos son: **defensa** del organismo a través de la fagocitosis de microorganismos; **limpieza** a través de la eliminación de restos celulares que aparecen durante la infección u otro tipo de daño tisular; **comunicación** con otras células del sistema inmunitario o tisulares a través de la secreción de citocinas y quimiocinas; actuar como **células presentadoras de antígenos** a los linfocitos T; y **promoción** de la reparación tisular al estimular la angiogénesis y la síntesis de matriz extracelular.

Los macrófagos como células presentadoras de antígeno

Los macrófagos tienen toda la maquinaria necesaria para procesar el antígeno y presentar péptidos exógenos y endógenos en el complejo mayor de histocompatibilidad (**MHC**) de clases II y I respectivamente, que activan a los linfocitos T (8).

Coordinación de la respuesta inflamatoria

Los macrófagos tisulares son capaces de iniciar y concluir la respuesta inflamatoria frente a una lesión tisular como una infección (9). Los macrófagos responden a la lesión mediante la liberación de interleucina 1 (**IL1B**), factor de necrosis tumoral (**TNF**) e **IL6** que atraen neutrófilos. Estas citocinas también activan la fosfolipasa A2 citosólica (10) que provoca la liberación del precursor del ácido araquidónico, que es el precursor de las prostaglandinas y los leucotrienos, por medio de las acciones de las vías de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa, respectivamente, dando inicio a la respuesta inflamatoria. La liberación de leucotrienos, prostaglandinas y quimiocinas atraen a monocitos y linfocitos. La completa eliminación del desencadenante inflamatorio inicia la resolución de la inflamación en la que se detiene la infiltración de neutrófilos y los macrófagos fagocitan los neutrófilos apoptóticos. El paso clave consiste en detener la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos y reemplazarlo por la síntesis de lipoxinas, resolvinas y protectinas.

La captación de células apoptóticas estimula la síntesis de **lipoxina A4** la cual reduce la actividad del neutrófilo, aumenta la migración de los monocitos, aumenta la captación de neutrófilos apoptóticos e inhibe la síntesis de las quimiocinas CXCL5 y CXCL8. La **resolvina E1** y la **protectina D1** aumentan la expresión de la quimiocina CXCR5 en la superficie de los neutrófilos apoptóticos, lo que facilita la disminución de CXCL3 y CXCL5 de la zona inflamatoria. A su vez, los neutrófilos expresan lisofosfatidilcolina para atraer a los macrófagos. La captación de estos neutrófilos por los macrófagos inhibe la producción de IL23A, una citocina implicada en la promoción de la granulopoyesis. El reconocimiento de células apoptóticas por los macrófagos conduce también a la producción de las citocinas antiinflamatorias IL10 y TGFB1, que, junto con factores como el factor de crecimiento endotelial vascular, promueven la reparación tisular (7-8, 11).

Secreción de citocinas

Los macrófagos secretan diversas citocinas (interleucinas, interferon, quimiocinas) para comunicar a otras células que contribuyan con la defensa del organismo (ver **tabla1**).

Tabla 1: Citocinas producidas por los macrófagos, receptores en las células dianas y sus funciones biológicas. Adaptado del libro Inmunología en su séptima edición del autor Abul K. Abbas y colaboradores.

Citocina	Receptor	Principales dianas celulares y efectos biológicos
TNF	TNFRSF1A TNFRSF1B	Células endoteliales: activación Neutrófilos: activación Hipotálamo: fiebre Hígado: síntesis de proteínas de fase aguda

		Músculo, grasa: catabolismo Muchos tipos celulares: apoptosis
IFNA1	IFNAR1 IFNAR2	Todas las células: estado antivírico, aumento de expresión de clase I del MHC Linfocitos NK: activación
IL1RN	IL1R1	Varias células: antagonista competitivo de IL1B
IL1B	IL1R1, IL1RAP, IL1R2	Células endoteliales: activación Hipotálamo: fiebre Hígado: síntesis de proteínas de fase aguda
IL6	IL6R, IL6ST	Hígado: síntesis de proteínas de fase aguda Linfocitos B: proliferación de células productoras de anticuerpos
IL10	IL10RA IL10RB	Macrófagos, células dendríticas: inhibición de producción de IL12B y expresión de coestimuladores y moléculas de la clase II del MHC. Antiinflamatorio.
IL12B	IL12RB1, IL12RB2	Linfocitos T: Diferenciación T _H 1 Linfocitos NK y linfocitos T: síntesis de interferón gamma (IFNG), aumento de actividad citotóxica
IL15	IL15RA IL2RB IL2RG	Linfocitos NK: proliferación Linfocitos T: proliferación (linfocitos CD8 ⁺ memoria)
IL18	IL18R1, IL18RAP	Linfocitos NK y linfocitos T: síntesis de IFNG
IL19	IL20RA IL10RB	Macrófagos: estimula secreción de IL-1 y TNF Queratinocitos: proliferación
IL23A	IL23R, IL12RB1	Linfocitos T: mantenimiento de linfocitos T productores de IL17A
IL27	IL27RA IL6ST	Linfocitos T: diferenciación T _H 1; inhibición de linfocitos T _H 1 Linfocitos NK: síntesis de IFNG
CSF1	CSF1R	Progenitores hematopoyéticos: maduración de monocitos
CSF3	CSF3R	Progenitores hematopoyéticos: maduración de granulocitos

Fagocitosis y endocitosis

La fagocitosis y endocitosis son mecanismos de defensa y limpieza de los macrófagos. Ambos mecanismos presentan pasos similares pero se diferencian en que la fagocitosis engulle partículas más voluminosas como una célula o bacteria mientras que la endocitosis atrapa partículas más pequeñas como lipoproteínas o glucoproteínas. La **endocitosis**

interioriza al citoplasma compuestos solubles a través de la generación de vesículas llamadas **endosomas** mediada por receptores. Los endosomas maduran, fusionándose con diferentes vesículas endocíticas desde los compartimientos temprano y tardío y finalmente se dirige a los lisosomas cuyo contenido degrada el contenido endosómico (8).

Por su parte en la fagocitosis se interiorizan partículas mayores de $0,5 \mu\text{m}$ tras su reconocimiento por receptores. La fagocitosis se produce por la generación de pseudópodos y formación de **fagosomas**, los cuales siguen un proceso de maduración secuencial a través de la fusión con endosomas tempranos y tardíos; este proceso culmina con la fusión de los fagosomas y lisosomas para formar los **fagolisosomas** y degradación de su contenido (8). Los fagosomas tempranos y tardíos no requieren calcio, pero la unión y fusión de los lisosomas con fagosomas tardíos si requieren calcio porque pueden necesitar la polimerización de actina (ver **figura 1**) (12).

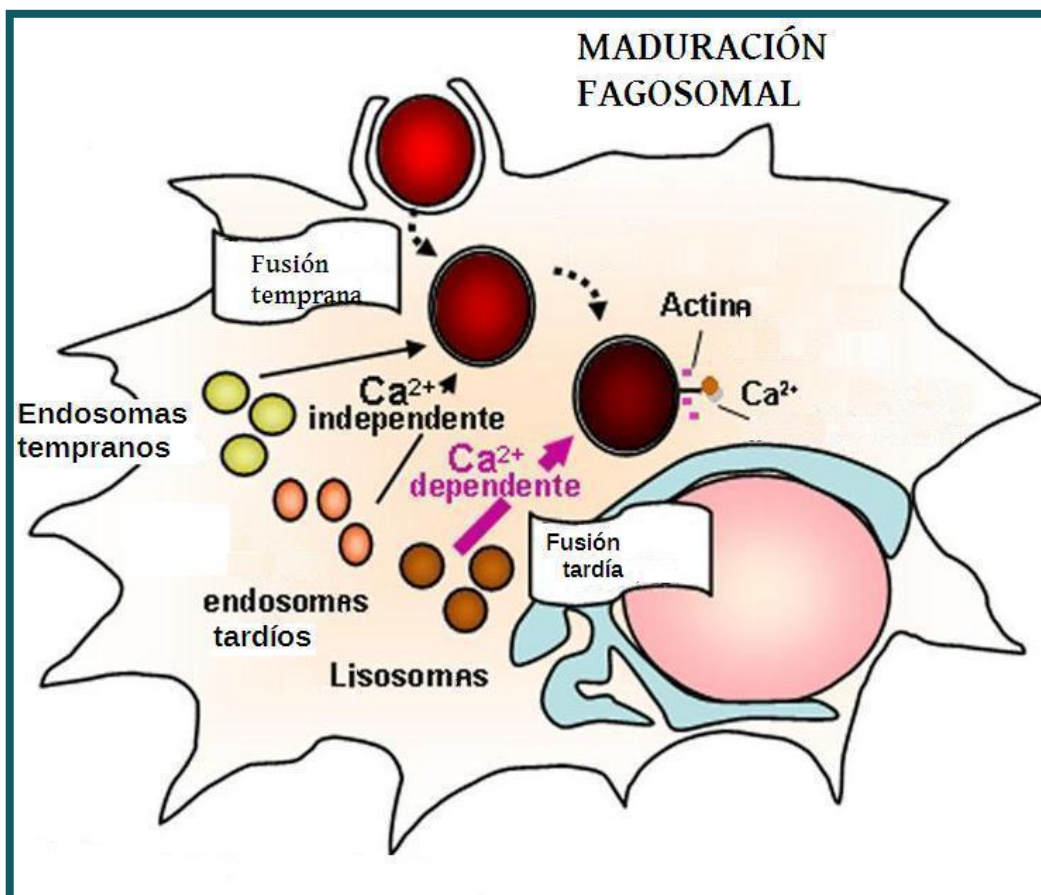


Figura 1: Maduración de los fagosomas en los macrófagos. Figura adaptada de Nunes, 2010.

Mecanismos microbicidas presentes en fagosomas y fagolisosomas

La maduración fagosómica se acompaña de la **acidificación de la luz** (de 6,1-6,5 en los fagosomas tempranos a 4,5 en los fagolisosomas), mediante la formación de un gradiente de iones H^+ por la ATPasa vacuolar. La acidificación tiene actividad microbicida directa y facilita la acción de enzimas que tienen un rendimiento óptimo a pH ácido.

Otro mecanismo microbicida lo constituyen las **defensinas** que son polipéptidos pequeños muy catiónicos de 30 a 33 aminoácidos que forman canales permeables a los iones en la bicapa lipídica de una gran variedad de microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus* (cocos gram positivos), *Escherichia coli* (bacilos gram negativos), *Cryptococcus neoformans* (levaduras) y virus envueltos.

Otro mecanismo que limita el crecimiento bacteriano en los fagosomas es el secuestro de nutrientes esenciales por la **lactoferrina** gracias a sus propiedades quelantes del Fe^{3+} o el transportador de membrana **SLC11A1**, que extrae Fe^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} de la luz (13). Además, los fagosomas contienen **endopeptidasas**, **exopeptidasas** e **hidrolasas**, que destruyen los microorganismos patógenos (8).

El mecanismo microbicida más conocido presente también en fagosomas y fagolisosomas, incluye la secreción de radicales libres derivadas del oxígeno (**ROS**) y derivadas del nitrógeno (**RNS**). Por su trascendencia en esta Tesis le dedicamos un apartado especial. En la **figura 2** se resumen los principales mecanismos microbicidas presentes en fagosomas y fagolisosomas.

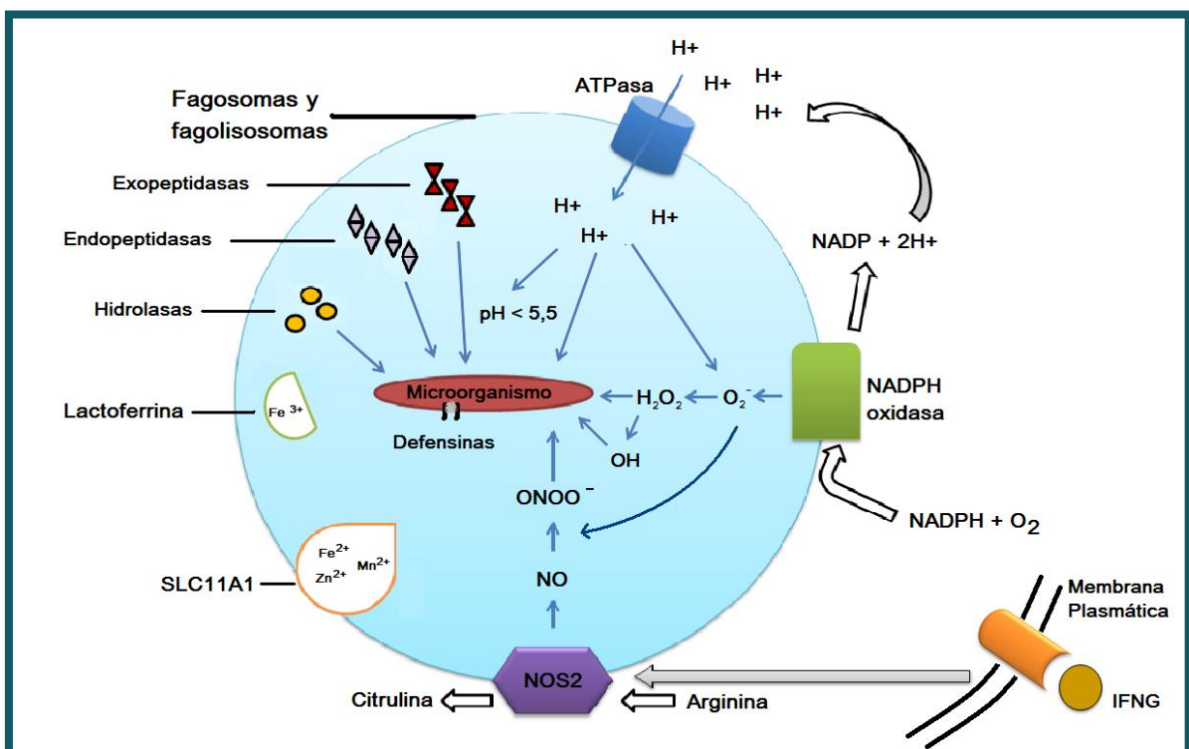


Figura 2: Mecanismos microbicidas presentes en fagosomas y fagolisosomas

ROS y RNS

Los radicales libres son especies químicas que poseen un electrón desapareado en su orbital más externo. El electrón desapareado le confiere alto poder oxidante o reductor y hace que reaccionen de inmediato para lograr mayor estabilidad química. Dentro del

fagosoma los microorganismos contienen proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos que son los principales compuestos químicos que reaccionan con los radicales libres, lo que resulta en alteraciones en la composición, estructura o función de dichas biomoléculas y contribuyen a la muerte microbiana (14).

Los radicales libres se clasifican de acuerdo con el tipo de átomo del cual provienen (ver **Tabla 2**). Tanto los radicales del oxígeno como los del nitrógeno son producidos normalmente a bajas o moderadas concentraciones por el metabolismo celular. Los radicales libres no sólo participan en la defensa frente a microorganismos, también participan en los sistemas de señalización celular durante la respuesta celular a la anoxia-hipoxia, en el mantenimiento del equilibrio de oxido-reducción y en la inducción de una respuesta mitogénica (14).

Tabla 2: Especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno. Tabla adaptada de Gutierrez-Salinas, 2014.

Tipo	Especie reactiva	Vida media (segundo)	Símbolo
Derivados del oxígeno	Superóxido	10^{-4}	O_2^{*-}
	Radical hidroxilo	10^{-9}	$*OH$
	Peróxido dehidrógeno	estable	H_2O_2
	Radical peroxilo	~ 1	ROO^*
	Hidroperóxido orgánico	estable	$ROOH$
	Oxígeno singlete	10^{-6}	$\Delta g'O_2$
	Ozono	~ 1	O_3
Derivados del nitrógeno	Óxido nítrico	~ 1	NO^*
	Peroxinitrito	10^{-3}	$ONOO^*$
	Ácido peroxinitroso	Moderadamente estable	$ONOOH$
	Dióxido de nitrógeno	~ 1	NO_2

Los radicales libres derivados del oxígeno se producen en la membrana plasmática y otros compartimientos intracelulares por reacciones de oxido-reducción catalizadas por las enzimas nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADH) reductasa, la xantino-oxidasa, la citocromo C-reductasa y otras deshidrogenasas y también se producen en la cadena respiratoria de las mitocondrias. En la cadena respiratoria, la molécula de oxígeno puede aceptar un total de cuatro electrones y sus correspondientes protones, uno a la vez; lo cual genera dos moléculas de agua. Se ha reportado que de todo el oxígeno molecular que pasa por la cadena respiratoria sólo 2-3% se convierten en radicales del oxígeno.(14)

Los radicales libres derivados del nitrógeno se producen a partir de la conversión de la L-arginina en L-citrulina a través de la enzima oxido-nítrico-sintetasa (NOS) formando un gas de vida corta, difusible y soluble en lípidos llamado óxido nítrico (NO). Los radicales del nitrógeno pueden nitrosilar diversas macromoléculas y alterar su estructura (14).

Los macrófagos alcanzan su máxima actividad microbicida en presencia de IFNG expresando cantidades elevadas de óxido nítrico sintasa inducible (NOS2), que cataliza la producción de NO a partir de la arginina. Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno pueden interaccionar para producir peroxinitritos, y todas ellas actúan dentro del fagosoma para provocar efectos tóxicos sobre los organismos patógenos. El peroxinitrito actúa como agente de nitración y como un potente oxidante capaz de modificar las proteínas (formación de nitrotirosina), lípidos y ácidos nucleicos. De esta forma se ven afectados el metabolismo y la replicación bacterianos (8), (14) (ver **figura 2**).

Receptores de reconocimiento de patógenos en macrófagos y sus vías de señalización

Los macrófagos tienen variedad de receptores que pueden clasificarse en **opsónicos** y **no opsónicos**, dependiendo de su capacidad para interactuar directamente con los estímulos o su necesidad de unirse a una molécula como un anticuerpo o fragmentos del complemento, que actúan como opsoninas (8).

Receptores opsónicos y opsoninas

Los receptores del complemento (**CR**) y los receptores para las regiones constantes ó Fc de los anticuerpos (**FcR**) son los receptores opsónicos de los macrófagos, los cuales se unen a bacterias opsonizadas por fragmentos del C3, pentraxinas, colectinas, ficolinas o anticuerpos e inician la fagocitosis. Los monocitos y macrófagos expresan una amplia variedad de receptores de complemento, concretamente **CR1**, **CR3** (15) y **CR4**. Los FcR pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y tienen una alta afinidad para inmunoglobulina G (**IgG**). La unión entre la bacteria y el macrófago se potencia si participan varias opsoninas (ver **tabla 3**) (8).


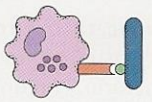
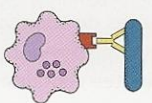
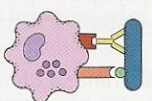
fagocito	opsonina	unión
1 	-	±
2 	factor del complemento C3b	++
3 	anticuerpo	++
4 	anticuerpo y complemento C3b	++++

Tabla 3: Potencia de la unión bacteria-fagocito mediada por opsoninas. Tabla adaptada de Male, 2013.

El C3 es la proteína central del sistema de complemento que en presencia de C3 convertasa se escinde en C3a que estimula la inflamación y C3b que se une mediante enlaces covalentes a la superficie de los microorganismos para favorecer la fagocitosis o también la formación del complejo de ataque a la membrana.

La familia de las pentraxinas es un grupo de proteínas pentaméricas. Las más conocidas son las pentraxinas cortas: proteína C reactiva que reconoce la fosforilcolina bacteriana y amiloide sérico P (APCS) que reconoce la fosfatidiletanolamina bacteriana. La pentraxina larga más conocida es PTX3 que reconoce varias moléculas presentes en hongos, bacterias y virus (16).

Las colectinas son una familia de proteínas triméricas o hexaméricas en las que cada subunidad contiene una cola similar al colágeno conectada por un cuello a una cabeza de lectina tipo C. Las colectinas que favorecen la fagocitosis son la lectina ligadora de manosa (MBL) y las proteínas del surfactante pulmonar (SFTPA1 y SFTPD) (16).

Las ficolinas son proteínas con una estructura similar a las colectinas, que presentan un dominio de reconocimiento glucídico de tipo fibrinógeno en lugar de un dominio de lectina; que se unen a el ácido lipoteicoico y la N-acetilglucosamina (GlcNAc) de las bacterias gram positivas y a GlcNAc presente en *Salmonella spp* y *Escherichia spp* (17).

Receptores no opsónicos y sus vías de señalización

La fagocitosis de microorganismos no mediada por opsoninas, se inicia con el reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos (**PAMP**) a través de los receptores de reconocimientos de patrones (PRR) o receptores no opsónicos. Los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos son el prototipo de PAMP. Otros PAMPs incluyen al ácido lipoteicoico y peptidoglucanos para las bacterias gram positivas, y fragmentos de ácidos nucleicos en los virus. La existencia de diferentes tipos de receptores no opsónicos permite identificar múltiples moléculas microbianas, los cuales describiremos a continuación.

Receptores tipo Toll

Los receptores no opsónicos mejor conocidos en los macrófagos son los receptores tipo Toll (TLR), los cuales son glucoproteínas integrales de membrana tipo I que presentan una región extracelular responsable de la unión al ligando, que contienen repeticiones ricas en leucina rodeadas por unas estructuras características ricas en cisteína y un dominio citoplasmático responsable de desencadenar una cascada de señales intracelulares, que contiene un dominio TIR.

Los TLR pueden formar heterodímeros y homodímeros entre sí, o complejos con otros receptores con la finalidad de detectar una amplia variedad de compuestos microbianos.

Además pueden localizarse en la superficie celular o en los endosomas. Los TLR que se expresan en los macrófagos se detallan en la **tabla 4**. Los humanos expresan los TLRs del 1 al 10 y en el ratón están descritos los TLRs 1-9 y 11-13 (18). El TLR10 sólo se expresa en células B y células dendríticas en humanos (19).

Tabla 4: Receptores TLR de los macrófagos y sus ligandos. Tabla adaptada de Male, 2013.

Receptor	Localización	Ligando	Microorganismo patógeno
TLR1	Superficie celular	Lipopéptidos	Bacterias gram negativas
TLR1/TLR2	Superficie celular	Lipoproteína triacilo, factor soluble	Bacterias
TLR2	Superficie celular	Ácido lipoteicoico (LTA), lipoproteínas, glucolípidos, lipoarabinomananos, LPS y fimbrias, GPI, HSPD1, HSPA4 y HSP90B1 (9)	Bacterias espiroquetas, micobacteria, levaduras, <i>Trypanosoma cruzi</i>
TLR2/TLR6	Superficie celular	Lipoproteína diacilo, GBS-F, modulina	Bacterias
TLR3	Superficie celular o endosoma	dsRNA	Virus
TLR4	Superficie celular	LPS, flavolipina, proteína F, proteínas de envoltura, HSPD1, HSPA4, HSP90B1 (9), fibronectina, ácido hialurónico	Bacterias gram negativas, Chlamidias, flavobacteria, virus, retrovirus múridos
TLR5	Superficie celular	Flagelina	Bacterias
TLR6	Superficie celular	Lipopeptidos diacilo	Micobacterias
TLR7	Endosoma	ssRNA	Virus
TLR8	Endosoma	ssRNA	Virus
TLR9	Endosoma	DNA sin metilar	Bacterias

La cascada de señales intracelulares se inicia con la unión del ligando al TLR, lo que lleva a la dimerización de las proteínas TLR que provoca reclutamiento de proteínas adaptadoras como son **MYD88**, **IRAKs**, **TRAF6**, **TAB2** ó **TICAM1**, y éstas a su vez activan quinasas como MAPK y factores de transcripción. Los principales factores de transcripción activados son el NF-κB, la proteína de activación 1 (AP-1), el factor de respuesta al interferón 3 (IRF3) e IRF7. NF-κB y AP-1 estimulan la expresión de genes que codifican citocinas inflamatorias como TNF e IL1B, quimiocinas como CCL2 y CCL8 y las moléculas de adhesión endoteliales como la selectina. IRF3 e IRF7 promueven la producción de interferones tipo I (IFNA1 e IFN-β), importantes para las respuestas inmunitarias innatas antivíricas (ver **figura 3 y 5**) (20), (9), (21).

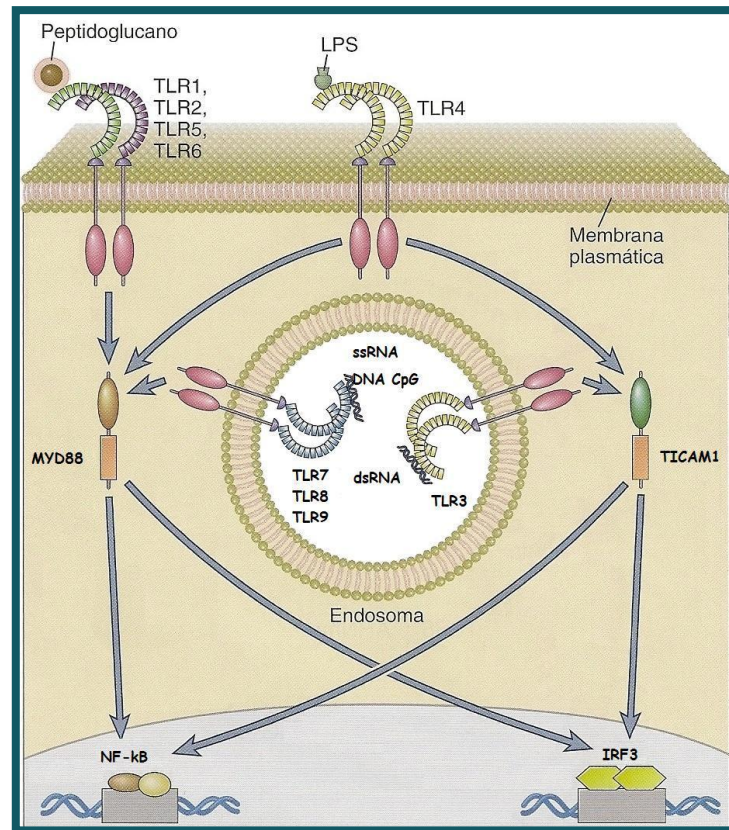


Figura 3: Señales intracelulares de los receptores TLR en los macrófagos. Figura adaptada de Abbas, 2013.

Todos los TLR, excepto TLR3, envían señales a través de MYD88 e inducen una respuesta inflamatoria. TLR3 transmite señales a través de TICAM1 y, por tanto, activa IRF3 e induce la expresión de interferones del tipo I. Por su parte, TLR4 transmite señales a través de MYD88 y TICAM1, y es capaz de inducir los dos tipos de respuestas. TLR3 también puede producir una respuesta inflamatoria independiente de MYD88 a través de TICAM1 (ver **figura 4**) (22), (23).

CD14 es una proteína de membrana que facilita el reconocimiento del LPS por el TLR4. CD14 está ligada al glicosilfosfatidilinositol (GPI) que lo ancla a la membrana citoplasmática e interacciona con el TLR, transfiriendo el LPS que está unido previamente con una proteína ligadora de LPS (**LBP**) al LY96, para después activar varias proteínas adaptadoras y así dar comienzo a la transducción de la señal (ver **figura 4**) (24). CD14 es una proteína multifuncional ya que también facilita el reconocimiento de ligandos por el TLR2 y TLR3. Por su parte, TLR4 también reconoce la matriz extracelular degradada y la proteína nuclear HMGB1, que puede liberarse de las células necrosadas (25), (26).

TLR2 puede reconocer ligandos con diversas estructuras a través de la combinación con otros receptores como TLR1 o TLR6 (ver **tabla 4**). Por su parte, la opsonina MBL2 es capaz de incrementar los efectos de TLR2 frente a *S. aureus* dentro del fagosoma. De hecho, en estudios con ratones deficientes de MBL2 se ha observado una disminución en la producción de citocinas como TNF, CCL5, CXCL2, CCL2, queratinocito quimioatrayente

(KC) e IFN y el desarrollo de una septicemia en comparación con ratones salvajes (27), (28), (29), (20).

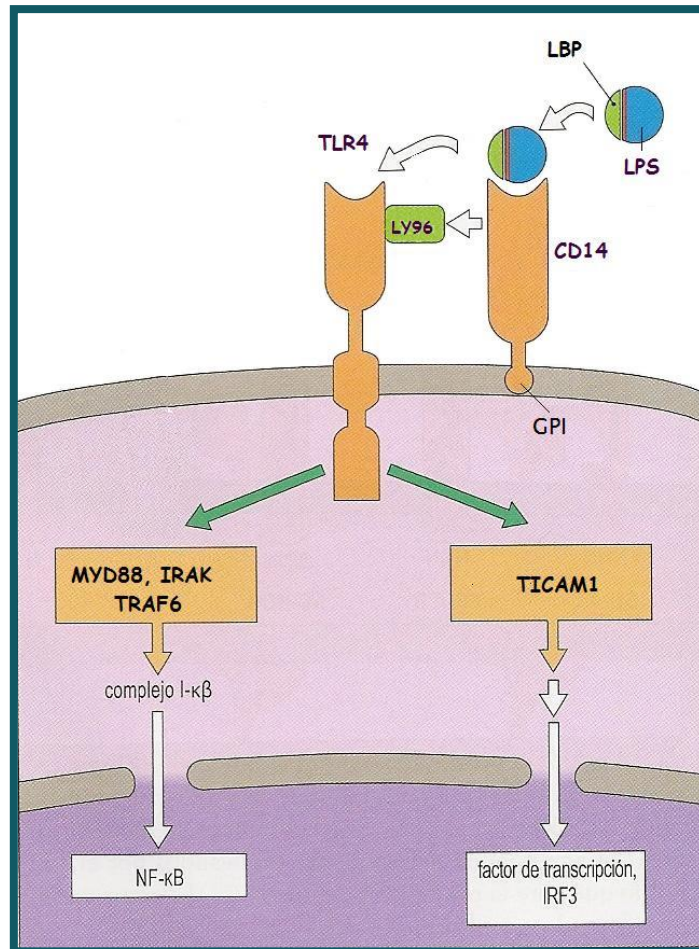


Figura 4: Interacción entre TLR4 y LY96 para identificar microorganismos en los macrófagos. Figura adaptada de Male, 2013.

Receptores tipo *scavenger*

Existen otros receptores no opsónicos tipo *scavenger*, como son **MSR1**, **MARCO** (30), **CD163**, **CD36**, y **SCARB1**(31), que participan en la eliminación de células apoptóticas, eritrocitos, colágeno (tipo I y IV), LTA, LDL oxidadas, ácido polirribonucleico y LPS. Los receptores tipo *scavenger* son capaces de unirse directamente a los microorganismos. Se ha demostrado que el receptor MSR1 se une a *Escherichia coli* favoreciendo su fagocitosis en células dendríticas (32), también MSR1 se une a la proteína NMB1220 de *Neisseria meningitidis* en los macrófagos (33), (34) ó el receptor SCARB1 que se une a *Mycobacterium tuberculosis* en macrófagos. Sin embargo, presentan un papel menor en la respuesta inmune y tienden a favorecer las respuestas generadas por el estímulo de otros receptores no opsónicos. Así que, por ejemplo son capaces de incrementar la producción de citocinas en macrófagos infectados con *M. tuberculosis* (31) o pueden servir para reducir las respuestas inducidas por la vía TLR4-CD14 y así limitar la liberación sistémica de TNF y el shock séptico resultante (32). Los receptores no opsónicos tipo *scavenger*

están en la superficie celular y sus mediadores intracelulares son desconocidos excepto para el receptor CD36 que se ha identificado a **Lyn** y **MAP3K2** (9). CD36 es capaz de ayudar al receptor TLR2 para reconocer a *Staphylococcus aureus* y *M. tuberculosis* (8).

Receptores lectina tipo C

Los receptores lectina tipo C son también receptores no opsónicos que se caracterizan por reconocer hidratos de carbono de microorganismos facilitando su fagocitosis y estimulando las respuestas inmunitarias adaptativas mediado por el calcio. Todos estos receptores tienen en común un dominio glucídico.

El receptor para la manosa **MRC1** es el receptor lectina tipo C más estudiado presente en la superficie celular. MRC1 es capaz de reconocer _D-manosa, _L-fucosa y _N-acetil-_D-glucosamina presentes en diversos microorganismos como son *M. tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Candida albicans*, *Pneumocystis jiroveci*, *Cryptococcus neoformans*, HIV, virus de la influenza, virus del dengue y Leishmania. También es capaz de unirse a otros ligandos para su posterior eliminación o reciclaje como son: hidrolasas lisosómicas, mieloperoxidasa, lutropina y colágeno (35) y además promueve las respuestas T_H2 . Sus mediadores intracelulares son **CDC42** y **Rho** (9).

El receptor **CLEC7A** contiene un dominio tipo lectina y una estructura tirosínica de activación del receptor inmunitario (**ITAM**) intracelular, que fagocita partículas de β -glucano presentes en la pared de *Candida albicans* en forma de levadura, gracias a la cinasa **SYK** y **CARD9**. Recientemente se ha descrito que contribuye con la respuesta microbicida del macrófago frente a Leishmania al activar SYK para la producción de caspasa 1 e IL1B (36). Además se ha descubierto que participa en la diferenciación del linfocito T *helper*.

El receptor **CLEC4E** se asocia a FcR γ para inducir señales intracelulares a través de SYK, CARD9 y MAPK para producir diversas citocinas y quimiocinas como son: TNF, CXCL2, CXCL1 e IL6. CLEC4E y los receptores TLR también pueden colaborar sinérgicamente (37), (38).

Otros receptores lectina tipo C descritos en los macrófagos son: **CD209** que modula las señales del TLR para promover la transcripción de varios genes de citocinas, en particular IL10 y CXCL8, CLEC4A, CD207 y CLEC6A.

Receptores citosólicos

Los receptores citosólicos macrofágicos son aquellos que reconocen la infección o el daño celular en el citoplasma. Los dos principales receptores citosólicos son: 1. Los receptores tipo helicasas (**RLH**) reconocen ARN bicatenario (dsRNA) que se produce durante la replicación viral. Por ejemplo, el receptor **RIG-I** reconoce el virus de la gripe mientras que el receptor **IFIH1** el virus de la poliomielitis. Ambas helicasas están asociadas a la

proteína adaptadora MAVS y activan IRF3 y NF- κ B. 2. Los receptores tipo NOD (**NLR**, *NOD-like receptors*) que se unen a nucleótidos y a peptidoglucanos bacterianos. La transducción de señales de estos receptores se realiza a través de RIPK2 para activar NF- κ B y MAPK (ver **figura 5**) (39), (9), (40).

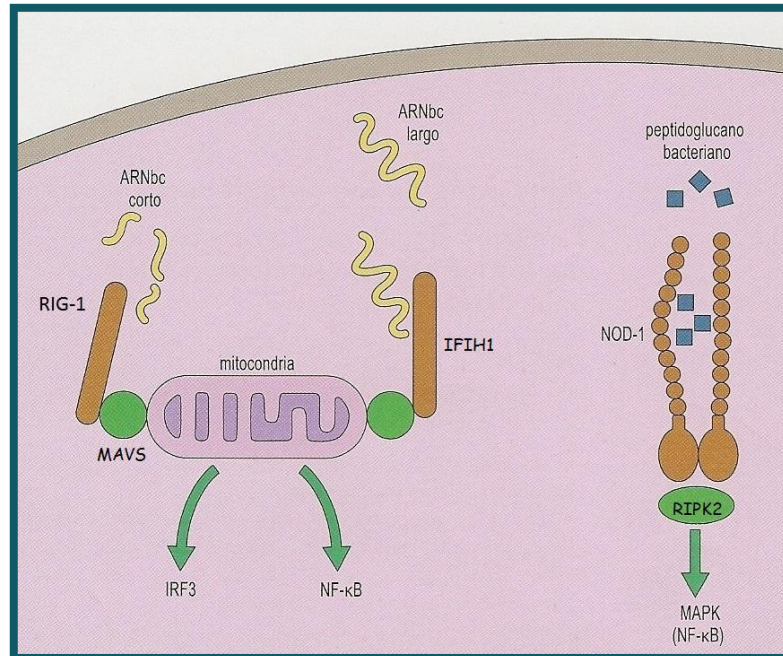


Figura 5: Receptores citosólicos y sus vías de señalización. Figura adaptada de Male, 2013.

La familia NLR se caracteriza por la presencia de un dominio central **NACHT** que regula la auto-oligomerización; un dominio **LRR** con repeticiones ricas en leucinas en el extremo C-terminal implicado en el reconocimiento del ligando y los dominios efectores en el extremo N-terminal **CARD**, **PYD** ó **BIR** que regulan la transducción de señales a través de interacciones proteína-proteína. El dominio NACHT es el único común a todos los miembros de la familia NLR; en cambio, los dominios en los extremos N-terminal y C-terminal pueden variar como se observa en la **figura 6**. El estudio filogenético permite distinguir tres subfamilias de la familia NLR tanto en humanos como en ratones que se denominan: **NOD**, **NLRP** e **IPAF** (ver **figura 6**) (41).

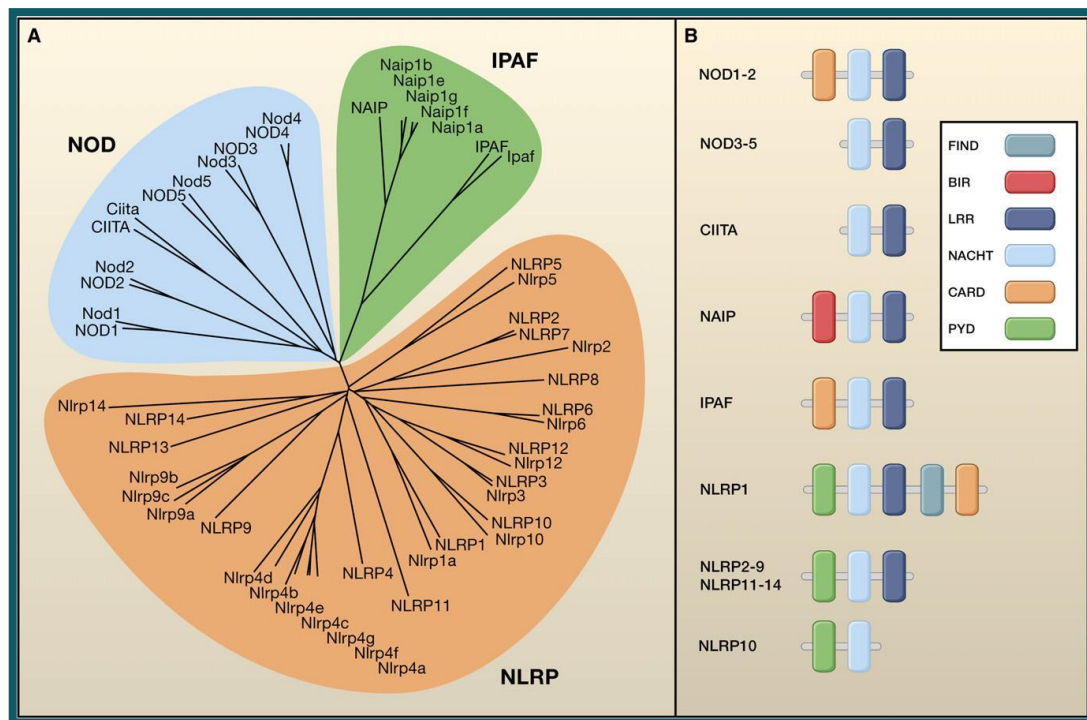


Figura 6: Miembros de la familia NLR en humanos y ratones. A. Relaciones filogenéticas de la familia NLR. Los miembros de la familia NLR en humanos están expresados en letras mayúsculas y los miembros de la familia NLR en ratones en letras minúsculas. B. Representación esquemática de los dominios que constituyen a algunos de los miembros de la familia NLR en humanos. Dominios: BIR; CARD; FIIND; LRR; NACHT; PYD. Figura adaptada de Schroder, 2010.

Algunos miembros de la familia NLR se dedican a la vigilancia citoplasmática de PAMP y patrones moleculares asociados a daños (**DAMP**). Los más conocidos en los macrófagos son NOD1 que contiene el dominio CARD4 y reconoce el ácido D-glutamil-meso-diaminopimelico (iE-DAP) de las bacterias gram negativas y el receptor NOD2 que contiene el dominio CARD15 y reconoce el dipéptido muramilo (MDP) procedente de bacterias gram positivas y gram negativas (9). NOD1 y NOD2 posterior a la unión con el ligando, reclutan RIPK2 a través de interacciones de los dominios CARD-CARD que culminan con la activación del factor de transcripción NF-κB que impulsa la traducción de genes proinflamatorios.

Otros miembros de la familia NLR responden a PAMP y DAMP citoplasmáticos formando inflamomas. El **inflamoma** es un complejo mutiproteínico que se ensambla en el citoplasma, activa la caspasa 1 y éste activa a las citocinas proinflamatorias IL1B e IL18 que pueden desencadenar la muerte celular inflamatoria de la célula infectada por un mecanismo conocido como piroptosis. La piroptosis provoca la liberación del contenido celular e induce la inflamación.

La composición del inflamoma varía dependiendo del estímulo iniciador los cuales pueden ser: flagelina, dipéptido muramilo, LPS, toxinas formadoras de poros, ARN bacteriano, ARN vírico, amianto, sílice, urato monosódico, pirofosfato de calcio, disminución de la concentración de potasio intracelular y especies reactivas de oxígeno.

Los inflammasomas más conocidos son los generados a partir de NLRP1, NLRP3 (42) (ver **figura 7**) eIPAF (41), (43), (44), (45).

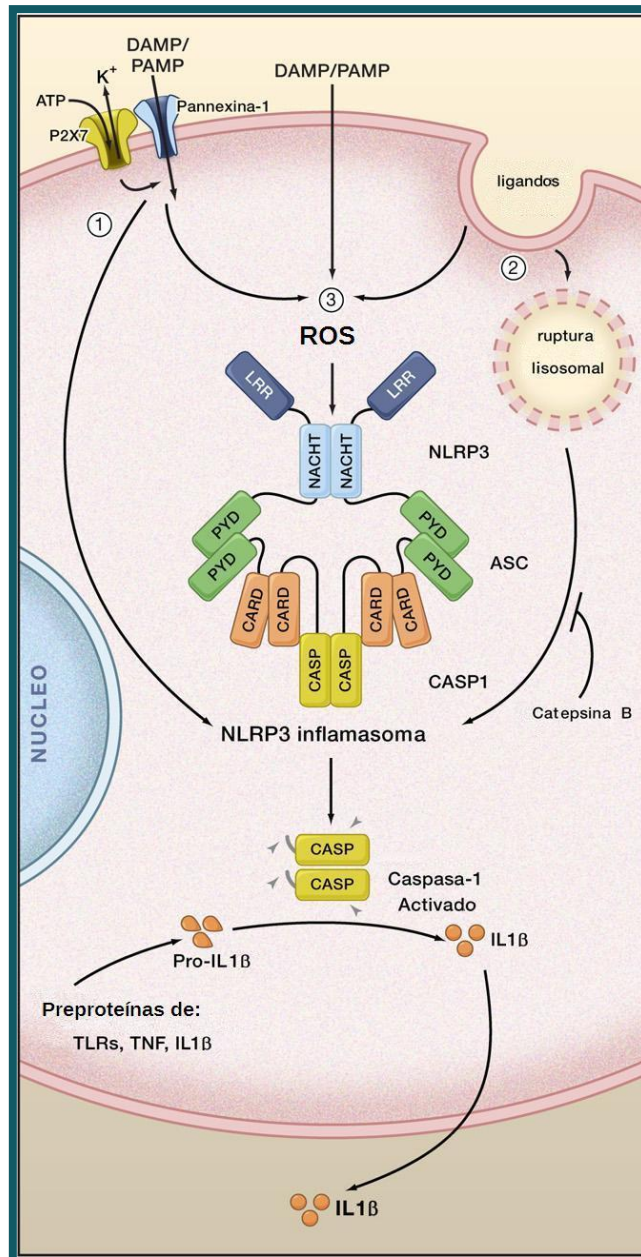


Figura 7: Vías de activación del inflammasoma NLRP3. (1) Las moléculas de ATP activan el poro P2X7 y así permiten la formación de hemicanales de panexina-1, por los cuales penetran los ligandos extracelulares y se acoplan a NLRP3. (2) Ligandos de NLRP3 son fagocitados y por sus características físicas conducen a la ruptura lisosomal. El NLRP3 detecta el contenido lisosomal en el citoplasma que puede ser a través de la cathepsina. (3) Ligandos de NLRP3 activan la generación de especies reactivas de oxígeno y éste activa la formación del inflammasoma. Figura adaptada de Schroder, 2010.

Receptores y fagocitosis de microorganismos

Es importante destacar que la fagocitosis de microorganismos se produce gracias a la participación conjunta de los diversos receptores antes mencionados, según sean bacterias gram positivas, bacterias gram negativas ó levaduras que la **figura 8** nos ilustra (16).

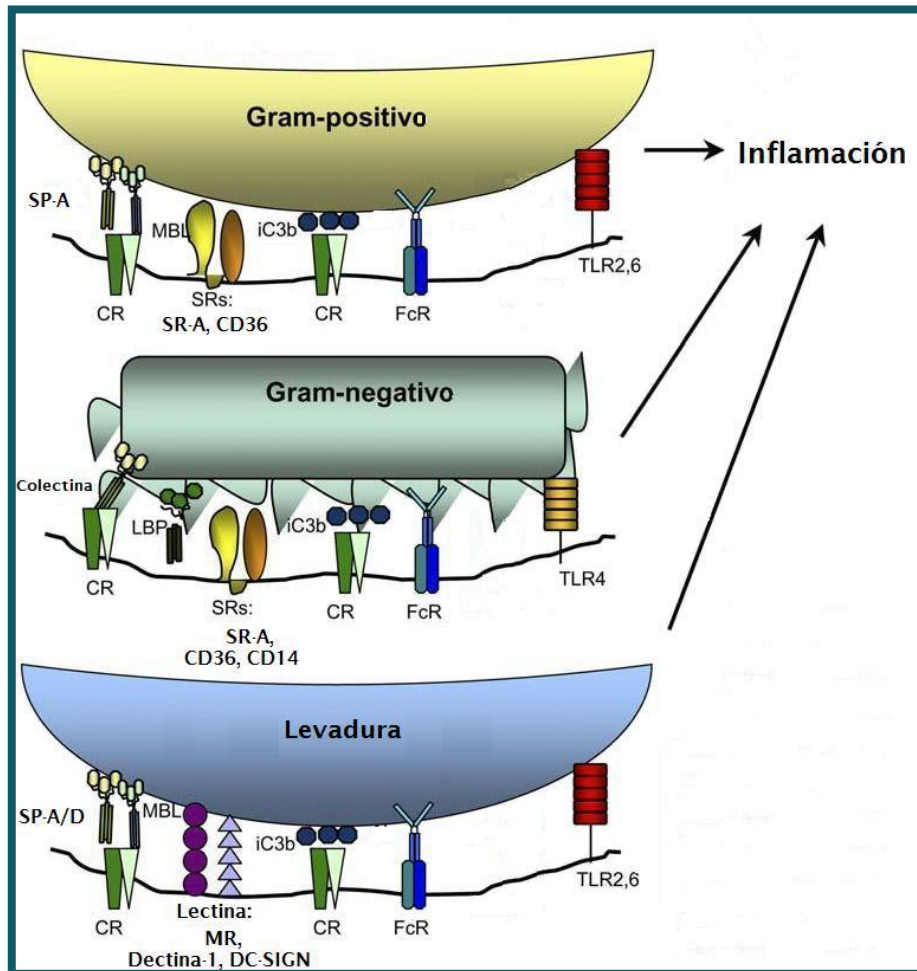


Figura 8: Receptores opsonícos y no opsonícos en los macrófagos. Los microorganismos según sean gram positivos, gram negativos o levaduras son reconocidos por una combinación de receptores opsonícos y no opsonícos que generan respuestas inflamatorias en los macrófagos. LBP son proteínas ligadoras de LPS. Figura adaptada de Stuart, 2005.

Citoesqueleto y modelos de fagocitosis en los macrófagos

El citoesqueleto es una red tridimensional y dinámica formada por **microtúbulos**, **microfilamentos** y **filamentos intermedios**. Las funciones que desempeña el citoesqueleto en los macrófagos son múltiples y vitales, siendo las más importantes: dar forma a la célula según el tejido en que se encuentre, transporte intracelular, participación en la división celular y en la fagocitosis (46).

Los microtúbulos son estructuras no ramificadas, constituidos por tubulina y que tienen 25 nm de espesor. **Tubulina** es una proteína globular que se codifica por dos genes y se traducen en dos proteínas: las tubulinas α y β que forman un heterodímero y es la unidad estructural de los microtúbulos. Por medio de la polimerización de los heterodímeros se forman **protofilamentos**, en los cuales se alternan las unidades α y β . Trece de estos protofilamentos configuran la pared de un microtúbulo. El punto de partida del sistema de microtúbulos es el **centrosoma** donde se encuentra una estructura cilíndrica llamada

centriolo formada por nueve tripletes de microtúbulos que se distribuyen de forma radial por el citoplasma y constituyen las vías para el transporte de vesículas y para la estabilización de la estructura celular (47).

Los microfilamentos en los macrófagos están constituidos por abundantes filamentos de **actina** y escasos filamentos de **miosina**. Actina es una proteína globular filogenéticamente conservada cuyos monómeros polimerizan formando filamentos que se entrelazan en doble hélice. Los microfilamentos participan en el mantenimiento de la forma celular, en procesos dinámicos como el movimiento ameboide y el proceso de fagocitosis (47), (46).

El tercer tipo de componente del citoesqueleto son los filamentos intermedios que tienen un espesor aproximado de 10 nm. Los filamentos intermedios proporcionan un andamiaje que integra a los otros componentes del citoesqueleto y organiza la estructura interna del macrófago (46).

El citoesqueleto y la **membrana citoplasmática** tienen una interacción recíproca. La membrana es un regulador clave del citoesqueleto, que proporciona sitios de unión para los componentes del citoesqueleto antes mencionados, a través de proteínas de transmembrana, lípidos e interacciones electrostáticas, y también sirve como la fuente de señalización que controlan la organización del citoesqueleto y su remodelación durante la fagocitosis. Por el contrario, el citoesqueleto es un factor determinante de las propiedades biofísicas y bioquímicas de la membrana, incluyendo su forma, tensión, movimiento, composición, así como la movilidad, la división celular y el reciclaje de sus componentes (48).

El elemento clave de la participación del citoesqueleto en la fagocitosis es la **remodelación de los filamentos de actina** que se produce a través de la señalización que se genera al activarse los receptores presentes en la membrana citoplasmática. Las moléculas de señalización más reconocidas son GTPasas pertenecientes a la subfamilia Rho; tales como, Rac y CDC42 (23) que estimulan a proteínas pertenecientes a la familia WASP (49), que activan al complejo Arp2/3 para la polimerización de los filamentos de actina por el extremo *plus* con consumo de energía, en forma de ATP. Los monómeros de actina provienen de la despolimerización de los filamentos por el extremo *minus* como podemos observar en la **figura 9**. Ésta remodelación dirigida de los filamentos de actina produce los movimientos celulares necesarios para englobar la partícula y fagocitarla (50-51).

En la remodelación de los filamentos de actina en los macrófagos también se ha descrito una proteína adaptadora llamada DEF6 que interactúa con Rac para provocar la reorganización del citoesqueleto. La sobreexpresión de DEF6 inhibe la habilidad fagocítica mediada por el receptor IgG FcR al reclutar la proteína DEF6 en la formación de los fagosomas tempranos. El reclutamiento de DEF6 en los fagosomas es más eficiente cuando los macrófagos expresan Rac1 ó Rac2. En ausencia de DEF6 se produce un aumento de la fagocitosis mediada por el receptor FcR, un aumento en la cantidad de filamentos de actina

alrededor de estos fagosomas, así como un aumento en la cantidad de proteína Rac1 reclutado en el fagosoma (52).

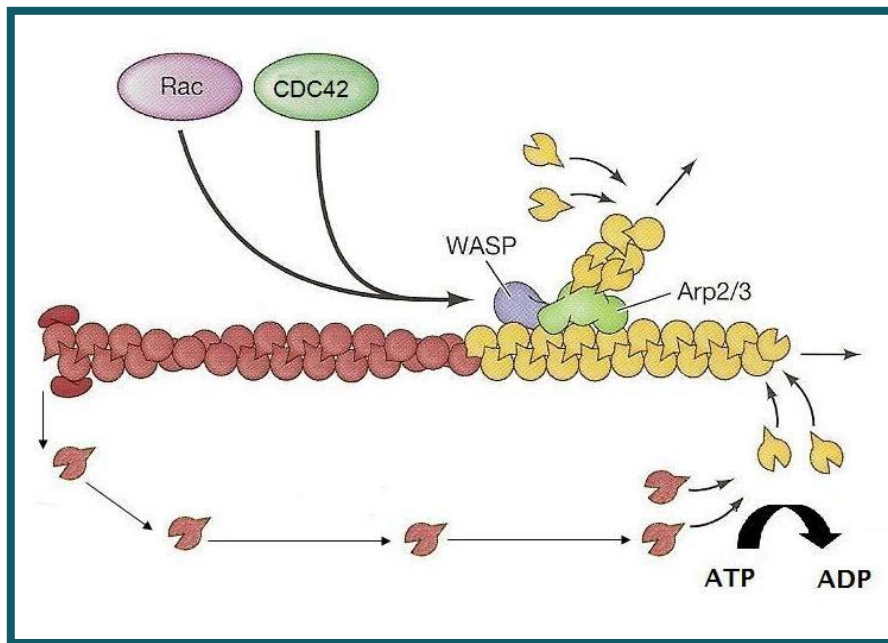


Figura 9: Formación de filamentos de actina. Polimerización y formación de filamentos de actina ramificados posterior a la estimulación de Rac y CDC42. Figura adaptada de Cooper, 2013.

El citoesqueleto y la membrana citoplasmática participan activamente en las etapas de la fagocitosis. Moller y colaboradores, presentaron un modelo de fagocitosis macrófágica con *Escherichia coli* que se muestra en la **figura 10** en la que resaltan la interacción entre el microorganismo y los receptores celulares para la formación de los pseudópodos (53).

Otro posible modelo de fagocitosis es el ofrecido por Masters y colaboradores quienes estudiaron la tensión superficial del macrófago y su repercusión en la fagocitosis de partículas inertes. Consideran que la **tensión superficial** es un activador de la exocitosis y éste paso es necesario para completar la fagocitosis. Además tomaron en consideración otros elementos como el reordenamiento de los filamentos de actina y GTPasas (ver **figura 11**) (54).

Luego de la fagocitosis los filamentos de actina que rodean al fagosoma se despolimerizan rápidamente (55), liberando al fagosoma para su maduración. Los fagosomas pueden presentar dos **tipos de movimientos** en el citoplasma, uno **lento** en la periferia de la célula mediado por la miosina V y filamentos de actina, que ocurre poco tiempo después de la fagocitosis y otro **rápido** que ocurre cuando el fagosoma alcanza el interior de la célula a través de los microtúbulos. Algunas GTPasas transforman GTP en GDP obteniendo energía para movilizar los fagosomas y fagolisosomas en los microtúbulos como son: Rab4a, rabfilina 11 y Rab5 (56), (57), (58).

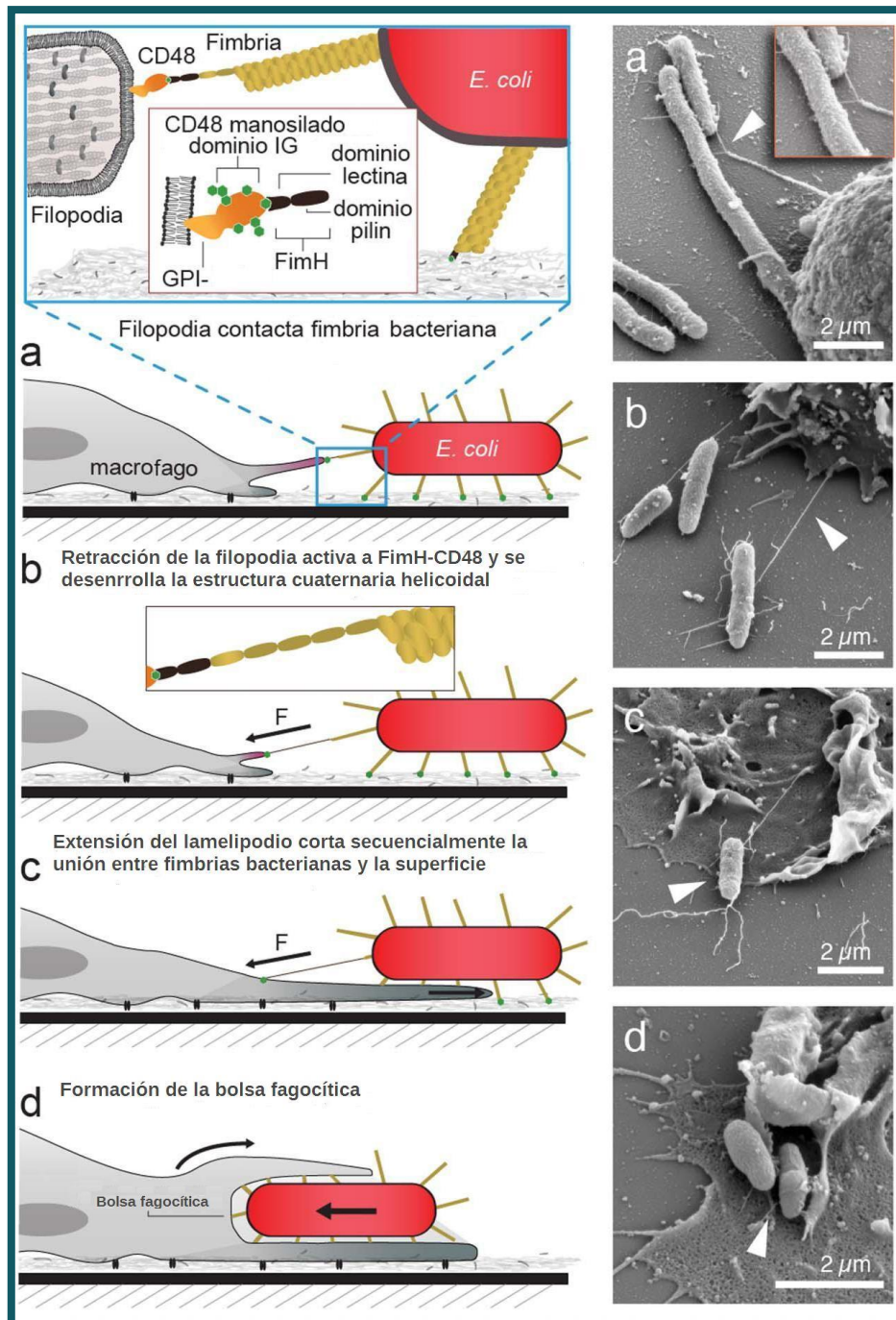


Figura 10: Modelo de fagocitosis macrofágica de *E. coli*. La fagocitosis macrofágica de *E. coli*. Se inicia con la interacción de la fimbria tipo 1 de la bacteria y el receptor de superficie anclado a la membrana CD48 de los macrófagos (a). El CD48 se une específicamente a la punta de la fimbria llamado FimH, que contiene un único sitio de unión a manosa en el dominio de lectina. (b) CDC42 induce en los macrófagos la formación de filopodios (57) que son proyecciones citoplasmáticas delgadas que al retraerse alargan la fimbria bacteriana gracias a que se desenrolla la estructura helicoidal cuaternaria de la fimbria. Como las bacterias se adhieren fuertemente a las superficies de sustrato a través de enlaces múltiples, los macrófagos no pueden tirar de las bacterias de la superficie a través de un solo filopodio. (c) Por tanto, para facilitar la captación, Rac1 induce en los macrófagos la formación de prolongaciones de forma laminar y transitorias, llamados lamelipodios (57), hacia la bacteria para romper secuencialmente los enlaces que anclan a *E. coli* a la superficie. (d) Una vez que la bacteria está completamente levantada de la superficie y se encuentra en el lamelipodio, se forma una bolsa fagocítica para internalizar la bacteria. Figura adaptada de Moller, 2013.

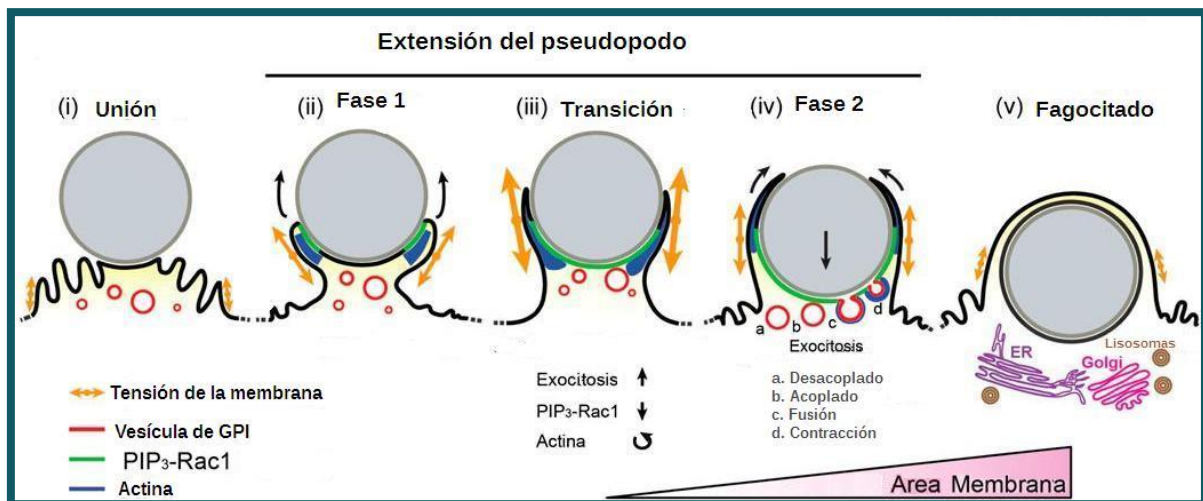


Figura 11: Modelo de fagocitosis en macrófagos de partículas inertes. Después de la unión de la partícula inerte a la membrana citoplasmática (i), la señalización de PIP₃-Rac1 se activa y la polimerización de actina empuja la membrana del pseudópodo hacia adelante y alrededor de la partícula durante la primera fase de la extensión de los pseudópodos (ii). La tensión superficial de la membrana es mayor en esta fase debido a la protrusión, provocando un agotamiento de los pliegues de la membrana. En la transición (iii) el aumento en la tensión de la membrana debido a la competencia entre el agotamiento del área de la membrana y la actividad protrusiva conduce a la desactivación PIP₃-Rac1 y la reorganización de las fibras de actina en el pseudópodo, así como la activación de la exocitosis. En la segunda fase de extensión del pseudópodo (iv), el área de la membrana se incrementa por exocitosis de vesículas que contienen proteínas ancladas a GPI. La internalización de la partícula se inicia cuando la extensión del pseudópodo envuelve progresivamente la partícula mientras entra en el citoplasma de la célula. Después de la inmersión (v), se inicia la maduración del fagosoma que posteriormente se fusiona con lisosomas y posiblemente con compartimientos del retículo endoplasmático. Figura adaptada de Masters, 2013.

Mecanismos de control de la fagocitosis en los macrófagos

Uno de los principales mecanismos de regulación de la actividad fagocítica de los macrófagos es a través de la expresión en sus membranas citoplasmáticas del **CD47** que se une al receptor **SIRPA** de los macrófagos. El receptor SIRPA presenta una estructura inhibidora tirosínica del receptor inmunitario (ITIM) que inhibe el inicio de la fagocitosis.

También es bien conocida la capacidad de la interleucina **IL21** de regular la actividad fagocítica de los macrófagos. IL21 es producida por linfocitos T CD4, células NK y células T *helper*. El receptor para IL21 se localiza en linfocitos T CD4, linfocitos T CD8, linfocitos B, células NK, macrófagos y células dendríticas, por lo que sugiere que IL21 participa en un amplio rango de funciones. IL21 inhibe significativamente la expresión de mRNA inducida por LPS, la expresión de IL1B, TNF e IL6 en macrófagos pero no inhibe los efectos de IFNG, IL10, CCL5 y CXCL2. IL21 disminuye la expresión de los marcadores de superficie de CD86, NOS2 y TLR4 en células estimuladas con LPS (59).

Evaluación de la fagocitosis: *in vitro* e *in vivo*

Uno de los ensayos más utilizados para evaluar la fagocitosis se realiza a través del **ensayo de protección con gentamicina**. Aunque en un principio este ensayo se diseñó para medir

la actividad bactericida, sucesivas investigaciones demostraron que también es útil para evaluar la fagocitosis.

El ensayo consiste en incubar un cultivo de la **célula eucariota** que se desee analizar en presencia de alguna **especie bacteriana** conocida. Luego se añade una dosis de gentamicina que permite eliminar exclusivamente los microorganismos no fagocitados. Se ha demostrado que la **gentamicina** no se acumula en el citoplasma de los macrófagos y que su concentración intracelular es aún más baja que la esperada por mecanismos de difusión simples. Además el bajo pH en los fagosomas reducen la actividad bactericida de la gentamicina y por último las bacterias fagocitadas pueden volverse insensibles al antibiótico ya que la proteína transportadora del antibiótico en su membrana es oxígeno dependiente y no funciona adecuadamente dentro del fagosoma (60). Posterior al tiempo de incubación con gentamicina, se realizan lavados para eliminar las bacterias extracelulares y el antibiótico; así que, sólo se conserva el cultivo celular con bacterias intracelulares. Éstas células se incuban nuevamente y finalmente se utilizan diferentes técnicas para medir la **capacidad bactericida** (si el tiempo de incubación total es superior a 2 horas) o la **capacidad fagocítica** (si el tiempo de incubación total es inferior a 2 horas). El porcentaje de recuperación de la especie bacteriana empleada se determina por cultivos de diluciones por lisis de las células fagocítica y del sobrenadante.

El ensayo de protección con gentamicina es muy versátil, ya que se puede modificar las **condiciones de experimentación** como el pH, la temperatura, el tiempo de incubación bacteria-célula, concentraciones de O₂ y CO₂. Pueden utilizarse células humanas, animales o líneas celulares ya conocidas. Pueden utilizarse bacterias con fenotipo salvaje o con modificaciones génicas. El ensayo también permite estudiar genes específicos o proteínas que interactúan entre la especie bacteriana y la célula, diseñando modelos experimentales sin el gen en estudio en la célula y compararlo con la célula salvaje.

Las técnicas complementarias que se utilizan con más frecuencia para medir la capacidad bactericida son: A. **Quimioluminiscencia**: durante la fagocitosis las células producen ROS que a su vez reaccionan con sustratos oxidables presentes en los microorganismos, produciendo intermediarios inestables que liberan energía lumínica al regresar a su estado basal, la cual es medida a través de un luminómetro y así se mide la respuesta oxidativa de los fagocitos ante una variedad de estímulos solubles y particulados. B. **Otros métodos bioquímicos específicos** para medir peróxido de hidrógeno, anión superóxido, síntesis de citocinas como IL1B, TNF o IL6, síntesis y liberación de óxido nítrico, entre otras manifestaciones de la actividad bactericida celular (61).

Las técnicas que se utilizan con más frecuencia para medir la capacidad fagocítica son: A. lisis de las células, cultivo y conteo de las unidades formadoras de colonias (**UFC**); B. medición por **citómetro de flujo** de la fluorescencia emitida por parte de las células fagocíticas que contienen en su citoplasma bacterias marcadas con un fluorocromo previamente; C. conteo de las bacterias marcadas con fluorocromo en el citoplasma de los fagocitos a través del **microscopio de fluorescencia**.

Generación de macrófagos

Como ya se ha mencionado, los macrófagos son células tisulares, por tanto, para realizar cualquier experimento es necesario utilizar previamente algún método para generar macrófagos, que presenten las **características fenotípicas** más parecidas a los macrófagos humanos que se deseen analizar. Para ello se pueden utilizar monocitos humanos o de animales de experimentación que son obtenidos a partir de: sangre periférica, médula ósea, esplenocitos, peritoneo ó también se pueden utilizar líneas celulares como THP-1. Luego se cultivan y/o incuban con diferentes factores que provocan la diferenciación hacia macrófagos.

Generación de macrófagos a partir de sangre periférica: se puede seleccionar los monocitos de la sangre periférica utilizando una solución de anticuerpos y separándolos del resto de los componentes hemáticos con un gradiente de densidad y lavados. Finalmente los monocitos son cultivados en placas con soluciones estándares como RPMI al 10% y suplementada con los factores de diferenciación según el fenotipo de macrófago que se quiere estudiar.

Generación de macrófagos a partir de médula ósea: los agregados de médula ósea se disgregan mecánicamente. Luego se resuspenden en tampón de lisis para lisar las células rojas y posteriormente sembrarlas en placas con soluciones estándares y suplementarlas con los factores de diferenciación (62).

Generación de macrófagos a partir de esplenocitos: se homogenizan muestras de bazo y los esplenocitos se pasan a través de un tamiz para eliminar los residuos. Las células se resuspenden y se cultivan con soluciones estándares y factores de diferenciación (62).

Generación de macrófagos peritoneales: en animales de experimentación se puede administrar periodato ó tioglicolato al espacio peritoneal y así estimular la generación de macrófagos a partir de monocitos que posteriormente se obtienen a través de un lavado peritoneal con soluciones estándares.

Generación de macrófagos a partir de THP-1: suelen utilizarse líneas celulares conocidas, en especial THP-1 que proviene de un paciente masculino de un año de edad con leucemia monocítica aguda. Las células THP-1 al ser activadas adquieren características similares a los macrófagos: dejan de proliferar para producir citocinas proinflamatorias, se adhieren a las superficies de plástico de las placas de cultivo y son capaces de fagocitar microorganismos. PMA y VD3 son usados comúnmente para inducir diferenciación en líneas monocíticas hacia macrófagos. Daigneault y sus colaboradores compararon diferentes protocolos y evidenciaron que los macrófagos diferenciados con PMA presentaron cambios similares a macrófagos derivados de monocitos (MDM) como son: aumento del radio nuclear, aumento del número de mitocondrias y lisosomas, resistencia a estímulos apoptóticos, niveles mantenidos de la proteína anti-apoptótica dependiente de la diferenciación MCL-1 y presencia de marcadores de superficie de

diferenciación celular similares. Estos macrófagos conservaron una alta capacidad fagocítica de partículas de látex y expresaron un perfil de citocinas que se asemejaba a MDM en respuesta a ligandos de TLR, en particular con TLR2 marcados (63). Sin embargo, otros autores han demostrado que puede diferenciarse THP-1 hacia macrófagos usando PMA a bajas concentraciones (desde 5 ng/ml). También demostraron que el uso de dosis elevadas (igual o mayor de 100 ng/ml) produce en la célula diferenciada sobreexpresión de algunos genes que pueden enmascarar la respuesta celular frente a estímulos débiles (64).

Por tanto, las condiciones de generación y diferenciación de los macrófagos tienen gran influencia en los fenotipos obtenidos debido a su gran plasticidad (65), versatilidad y multitud de funciones en las que participan en el sistema inmune.

Fenotipos de los macrófagos

Los macrófagos constituyen las células centinelas en los tejidos y se mantienen inactivos hasta que son estimulados. Cuando los macrófagos se activan presentan diferentes fenotipos, que describimos a continuación.

Los **macrófagos M1** se generan al ser estimulados con LPS, TNF, CSF2 o IFNG, lo que se denomina activación clásica (ver **figura 15**) (9). Son efectores proinflamatorios (secretan IL23A, IL12B, IL1B, IL6 y TNF) y tienen funciones bactericidas. Además, los macrófagos M1 promueven respuestas T_H1 al producir IL12B y secretar CXCL9 y CXCL10, que reclutan selectivamente linfocitos T_H1.

Los marcadores de superficie asociados al fenotipo M1 son: 1. TNFRSF1B que se ha relacionado con la supervivencia celular, activación de NF-κB, activación e incluso proliferación en otros tipos de células como los linfocitos T. 2. SLAMF7 que se ha descrito niveles elevados en macrófagos de pacientes con rechazo de aloinjerto de intestino (66).

Los **macrófagos M2** se generan por una activación alternativa (ver **figura 15**) y se dividen en subgrupos: **M2a** después de la exposición a IL-4 ó IL13 y producen CCL24, CCL22, CCL17 y CCL18 que son reconocidos por CCR3, CCR4 y CCR8 y promueven el reclutamiento de eosinófilos, basófilos y células T_H2; **M2b** después de la exposición a inmuno-complejos en combinación con IL1B o LPS y producen CCL1 el cual recluta linfocitos Tregs; **M2c** después de la exposición a IL10, TGFB1 o glucocorticoides y producen CCL16 que recluta eosinófilos y CCL18 que recluta linfocitos T naive (67) y **M2d** se producen en un microambiente tumoral y presentan un perfil M2 (IL10^{high} – VEGFA ^{high}) pero también exhiben algunas características M1 como la expresión de IFNG, CCL5, CXCL10 y CXCL16 (68).

Estos macrófagos M2 poseen menos actividad bactericida ya que producen menor cantidad de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (8), mejoran la eliminación de los desechos

celulares, promueven la remodelación y reparación de tejidos y aumentan la capacidad para combatir las infecciones parasitarias (69).

Los marcadores de superficie asociados al fenotipo M2 son: 1. CD1A y CD1B que son glucoproteínas de transmembrana que estructuralmente están relacionados con el MHC y median la presentación de lípidos y glucolípidos de los microorganismos a los linfocitos T. CD1A se localiza en la membrana plasmática y es útil para el reciclaje de vesículas del sistema endocítico temprano. En cambio, CD1B se localiza en endosomas tardíos y lisosomas a través de una base de tirosina en la cola citoplasmática, y requiere la acidificación vesicular para unirse a antígenos lipídicos. 2. CD93 es una glucoproteína de membrana tipo I implicada en procesos biológicos como la adhesión, migración y fagocitosis. Su cola citoplasmática intracelular interactúa con la proteína miosina la cual participa en la unión de las proteínas transmembrana al citoesqueleto y a su remodelación. 3. CD226 es una glucoproteína presente en la superficie celular, que en los monocitos favorece la adhesión al endotelio, pero en los macrófagos M2 está por definir sus funciones (66). En modelos murinos se han asociado al fenotipo M2 otros marcadores como son arginasa 1 (Arg1), Chil3 y Retnla (69).

Hay otros fenotipos de macrófagos descritos recientemente como son M4, Mhem y Mox. **M4** se generan después de la exposición a CXCL4 ó al factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF1) que es un importante factor de crecimiento, diferenciación y supervivencia, selectivo para monocitos y macrófagos y es producido por los fibroblastos, las células estromales, las células endoteliales, el músculo liso y el propio macrófago (8). Los macrófagos M4 producen CD86 y CD206. **Mhem** se generan después de la exposición a haptoglobina ó globulos rojos oxidados y producen CD163; y **Mox** se generan después de la exposición a Ox-PL-PPc (ver **figura 12**) (69).

Algunos autores han propuesto otra clasificación de los macrófagos activados de acuerdo con sus funciones: defensa del organismo, reparación de heridas y regulación inmunitaria. Además de estos tres grupos es posible definir numerosos estados funcionales intermedios, lo que indica que existe un amplio rango de estados de activación de los macrófagos para ejecutar muy diversas funciones *in vivo* (70), (71).

Otro aspecto a tomar en consideración son las diferencias que existen entre los macrófagos humanos y murinos. En ausencia de inflamación los macrófagos tisulares murinos son generalmente diferenciados hacia la subpoblación de monocitos murinos Gr-1 *low* CX3CR1 *high* CCR2⁻ CD62L⁻. Estas células se corresponden funcionalmente con la subpoblación humana de monocitos CD14⁺ CD16⁺ CX3CR1 *high* CCR2⁻ CD62L⁻. Durante la inflamación, los macrófagos se activan, se expanden y llegan nuevos monocitos inmaduros que rápidamente se diferencian a Gr-1 *high* CX3CR1 *low* CCR2⁺ CD62L⁺ en murinos o CD14 *high* CD16⁻ CX3CR1 *low* CCR2⁺ CD62L⁺ en humanos (9). También hay marcadores diferentes como por ejemplo, Arg1, que se expresa en macrófagos M2 murinos y no se expresa en macrófagos humanos (72 112).

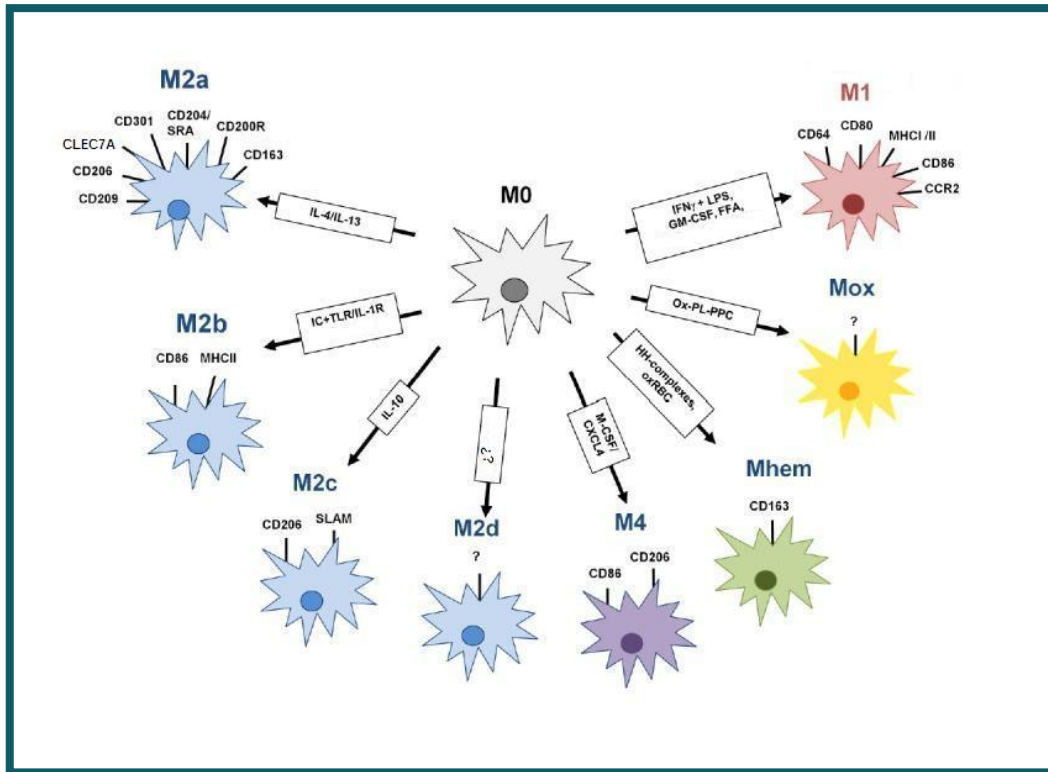


Figura 12: Fenotipos de macrófagos. Figura adaptada de Labonte, 2014.

Por tanto, los macrófagos presentan gran diversidad funcional. De hecho, existen algunos factores que contribuyen a esta diversidad funcional y que aún no han sido completamente definidos. Además, cuando se colocan macrófagos idénticos en diferentes microambientes son capaces de mostrar diferentes funciones en respuesta a un estímulo común. Los macrófagos también son capaces de cambiar su patrón funcional en el tiempo a medida que la respuesta progresa y por último son capaces de volver a su estado original o inactivo una vez que el estímulo original cesa (73 107).

FAMILIA DE PROTEÍNAS FAST (FAS-ACTIVATED SERINE THREONINE PHOSPHOPROTEIN)

La familia de proteínas FAST (Fas-activated serine threonine phosphoprotein), de reciente descripción, está integrada por seis proteínas de origen nuclear denominadas FAST (considerada el prototipo de la familia por ser la primera en describirse) y FASTKD1-5.

Todas ellas comparten una secuencia de localización mitocondrial amino terminal y tres dominios carboxilo terminal (FAST_1, FAST_2 y RAP). El dominio **RAP** de aproximadamente 60 aminoácidos es un dominio de unión a RNA y está presente en numerosas proteínas involucradas en *trans-splicing* (74). Los dominios **FAST_1** (70 aminoácidos) y **FAST_2** (90 aminoácidos) situados en el extremo carboxilo de todos los miembros de la familia FAST, tienen funciones desconocidas por ahora (ver **figura 13-A**). Las posiciones de los aminoácidos que flanquean estos dominios de proteínas se indican en

el **anexo A-1**. Las proteínas FASTKD tienen baja homología de secuencia fuera de los dominios mencionados (ver **anexo A-2**) (75).

Los **genes ortólogos de FAST** se encuentran en el antepasado común de los vertebrados como se observa en la **figura 13-B**. Se identificaron genes ortólogos de FAST en pez zebra (*Danio rerio*), en gallo (*Gallus gallus*), ratón (*Mus musculus*) y humano (*Homo sapiens*) que podemos detallar en el **anexo A-3**. La homología de secuencia entre los ortólogos es entre un 5 y un 10% mayor en los dominios FAST_1, FAST_2 y RAP que la observada en el dominio amino terminal. Algunos ortólogos pueden haber evolucionado independientemente lo que sugiere que estos genes pueden tener funciones no redundantes en vertebrados. La restricción de los miembros de la familia FASTKD a las clases de animales relativamente recientes, sugiere que estas proteínas pueden modular la regulación fina de producción de energía en la mitocondria (75).

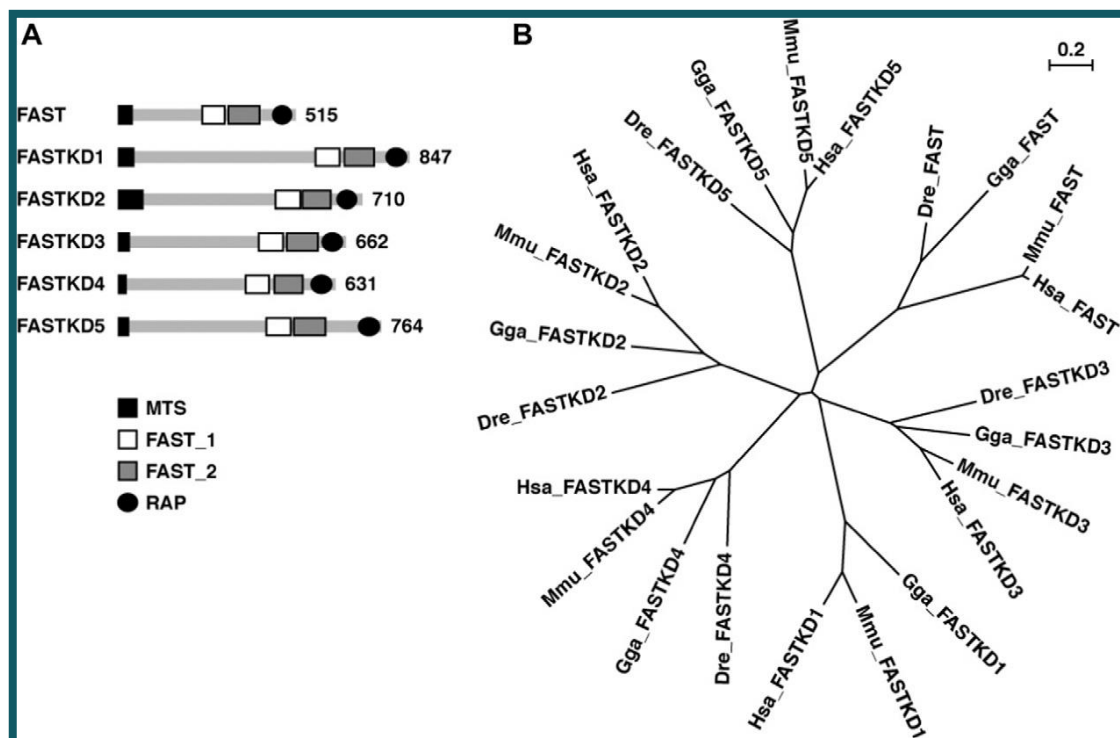


Figura 13: Estructura primaria de las proteínas FAST y FASTKD1-5. (A) Características de la estructura primaria de las proteínas FAST y FASTKD1-5 en humanos. MTS es la secuencia de direccionamiento mitocondrial. (B) Árbol circular de las secuencias de las proteínas FAST Y FASTKD1-5 en humanos (Hsa), ratones (Mmu), pollos (Gga) y pez cebra (Dre). La barra de escala indica la distancia genética y es equivalente a 0,2 sustituciones por aminoácidos. Figura adaptada de Simarro, 2010.

Las proteínas FASTKD1-5 poseen **secuencias de localización mitocondrial** que fueron confirmadas por inmunofluorescencia como se observa en la **figura 14** (75).

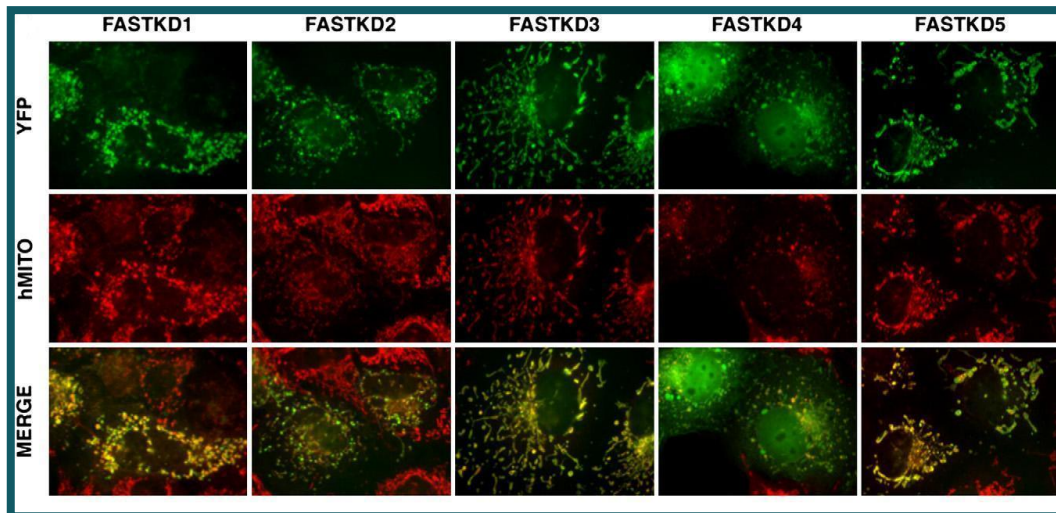


Figura 14: Localización celular de las proteínas FASTKD1-5. Las células COS-7 fueron transitoriamente transfectadas con plásmidos que codifican proteínas de fusión que consisten en cada uno de los miembros de FASTKD fusionados en su extremo carboxilo a la proteína fluorescente amarilla (YFP). Las células fueron teñidas con anticuerpos antimitocondrial de suero humano (M2) y analizado por inmunofluorescencia. Se presentan las imágenes individuales (YFP y hMITO) y combinadas (MERGE). Figura adaptada de Simarro, 2010

La **distribución tisular** de los transcritos de FASTKD1-5 fueron analizados en trece tejidos humanos y once tejidos de ratones mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) como se observa en la **figura 15**. Aunque todos los miembros de la familia FASTK se expresan de forma ubicua, algunos son particularmente abundantes en tejidos ricos en mitocondrias como el corazón, músculo esquelético y tejido adiposo pardo (75).

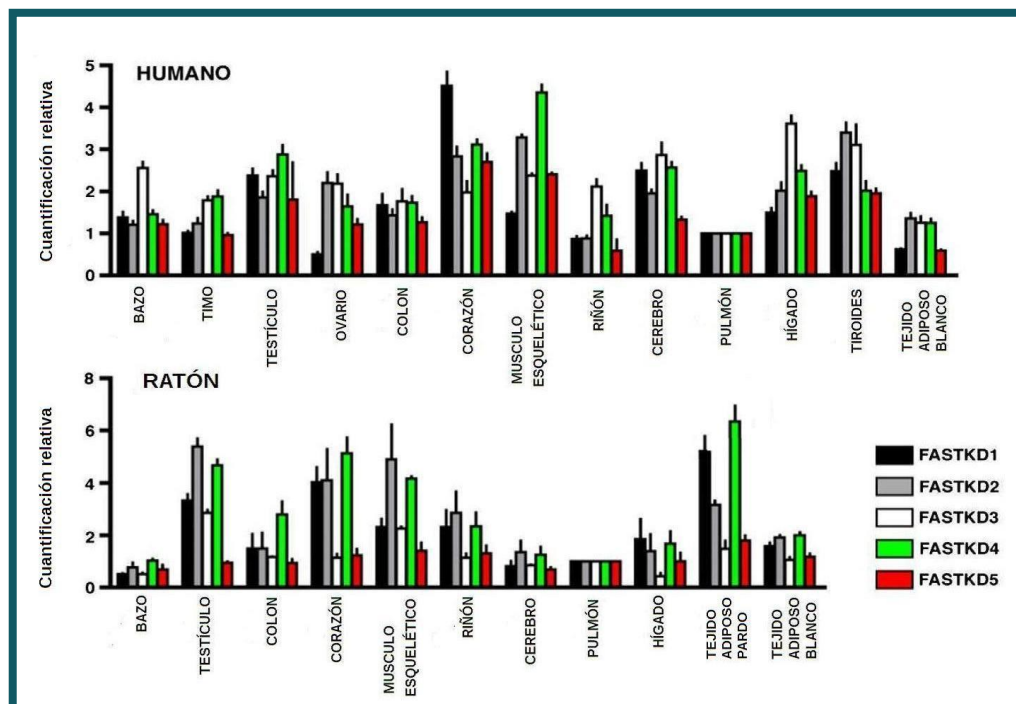


Figura 15: Distribución tisular de los genes de FASTKD1-5 en humanos y ratones. Distribución tisular de los genes de FASTKD1–5 en humanos (panel superior) y ratones (panel inferior). Los

resultados son expresados en relación con el nivel de mRNA en el pulmón. Figura adaptada de Simarro, 2010.

Los genes que codifican a los miembros de la familia FASTKD en humanos se encuentran en diferentes cromosomas que detallamos en la **tabla 5**.

Tabla 5: Localización de los genes de cada miembro de la familia FAST en los cromosomas de la especie *Homo sapiens*

Familia FAST	Localización en los cromosomas humanos
FAST	7q35
FASTKD1	2q31
FASTKD2	2q33.3
FASTKD3	5p15.31
FASTKD4	7p13
FASTKD5	20p13

Las funciones biológicas y los mecanismos moleculares de cada miembro de la familia FAST se están describiendo y estudiando activamente en estos últimos años, las cuales detallaremos a continuación.

FAST

FAST es una proteína multifuncional localizada en el núcleo celular, el citoplasma y las mitocondrias (76), (77), (78); además de ser la más estudiada de esta nueva familia. Las primeras descripciones se hicieron hacen unos 20 años aunque los hallazgos mas significativos han sido descritos recientemente y abarcan diferentes funciones intracelulares.

En el citoplasma, FAST se localiza en los **gránulos de estrés** y se encarga de modular la traducción de proteínas (75) mediante su interacción con el represor intracelular de células T (**TIA-1**). TIA-1 inhibe la producción de mediadores proinflamatorios que incluyen TNF, IL1B, IL6, ciclooxygenasa 2 y metaloproteinasa 13. Mediante la inhibición de la actividad de TIA-1, FAST promueve la traducción de estos mediadores (ver **figura 16**). Por tanto, FAST y TIA-1 tienen funciones antagónicas que ayudan a determinar si las células viven o mueren.

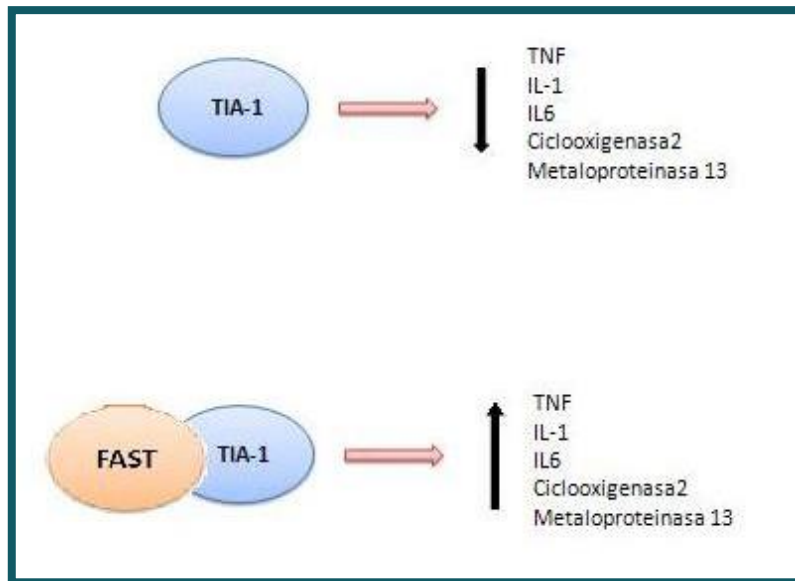


Figura 16: Esquema representativo de la función de FAST en los gránulos de estrés citoplasmáticos.

FAST y TIA-1 están también en el núcleo celular donde regulan el *splicing alternativo* de exones flanqueados por secuencias de reconocimiento con empalme débil. FAST promueve la inclusión del **exón 6** del mRNA del receptor Fas/CD95. El transcrito de Fas que incluye el exón 6 da lugar a un receptor transmembrana que promueve la apoptosis, mientras que el transcrito sin el exón 6 a un receptor soluble que inhibe la apoptosis (ver **figura 17**) (79).

También se ha descrito que FAST promueve la inclusión del **exon IIIb** en el mRNA del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (**FGFR2**). FGFR2 se puede producir a partir de dos transcritos que incluyen uno de los dos exones adyacentes y mutuamente excluyentes (IIIb o IIIc) que codifican receptores con distintas propiedades de unión a ligando. La variante FGFR2 IIIb es un receptor que participa en el mantenimiento del crecimiento y diferenciación de las células epiteliales sensible a andrógenos. La variante FGFR2 IIIc es crítica para la organogénesis y la progresión del cáncer de próstata. La inclusión del exón IIIb depende de un potenciador intrónico del empalme rico en uridina llamado IAS1 localizado inmediatamente después del exón IIIb. FAST no se une directamente a IAS1, sin embargo, permite a **U1-snRNP** unirse en el sitio de empalme 5' al interactuar con otros factores de unión de IAS1. De hecho, se ha encontrado que los últimos 188 aminoácidos de la proteína FAST son absolutamente necesarios para la inclusión del exón IIIb en el transcrito de FGFR2. Además, FAST se une a otros reguladores de *splicing* como son: HNRNPK, KHDRBS1, TIAL1 y SF3B4 (SAP49) como se observa en la **figura 17** (78).

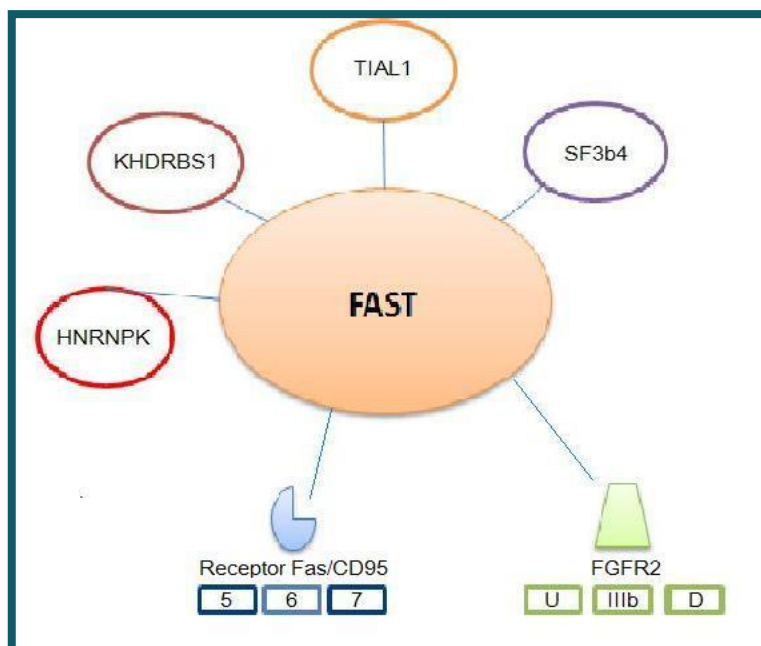


Figura 17: Esquema representativo de la participación de FAST en el núcleo para regular el splicing alternativo.

Recientemente se ha descrito la importancia de la proteína FAST **en la respuesta inmune innata**. Para ello, se generaron ratones modificados genéticamente que carecen del gen que codifica FAST (FAST KO) como se explica en material y métodos.

FAST está sobreexpresado en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con atopia, asma, diabetes tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico (80-81). Para comprender el papel de FAST en estas patologías se eligió el modelo de inflamación pulmonar alérgica en ratones porque utiliza un alérgeno clínicamente relevante con adyuvantes endógenos que rompen la tolerancia de la barrera mucosa. Este protocolo da como resultado una inflamación de las vías aéreas asociadas a respuestas T_H2 caracterizada por la presencia de linfocitosis, eosinofilia, neutrofilia e hiperplasia de células caliciformes a nivel broncovascular. Los ratones WT y FAST KO fueron expuestos al extracto de polvo de ácaros comunes (HDM) intranasal. Se observó que FAST no modula la inducción de respuestas T_H2 ni la inflamación alérgica de las vías respiratorias; sin embargo es necesario para el reclutamiento de los neutrófilos en los pulmones inflamados (77).

También se utilizó un modelo de daño pulmonar agudo inducido por LPS en ratones WT y FAST KO; donde se observa que la inflamación pulmonar fue significativamente menor en los ratones FAST KO en comparación con los ratones WT, con gran reducción en el número de neutrófilos en el lavado broncoalveolar como se observa en la **figura 18-A** y que se confirma con el análisis histológico del tejido pulmonar y espacios alveolares que se observan en las **figuras 18-B**.

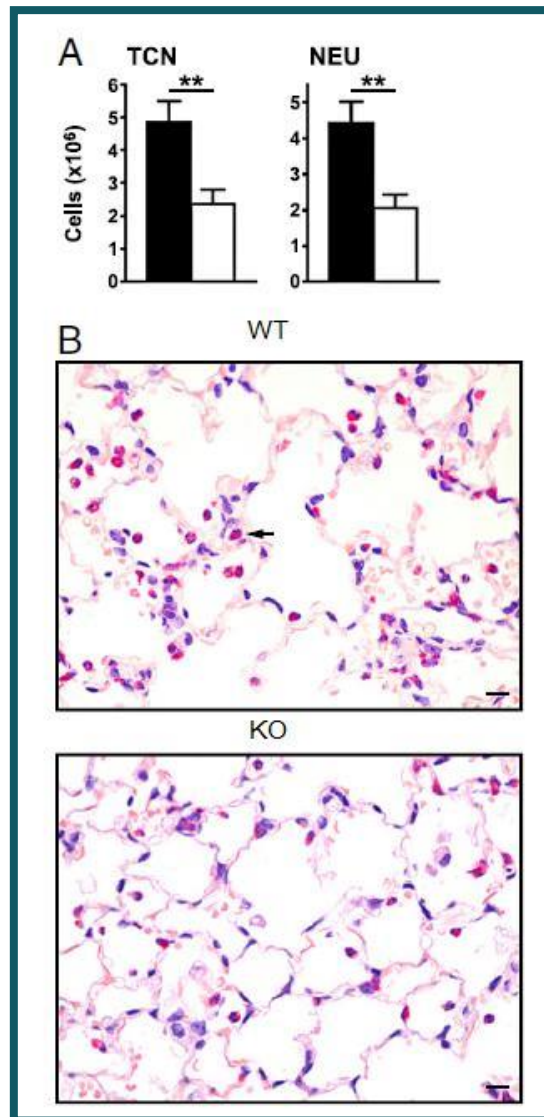


Figura 18: Inflamación pulmonar en ratones WT y FAST KO tratados con LPS. (A) Número total de células (TCN) y de neutrófilos (NEU) en lavado broncoalveolar de ratones WT (barras negras) y FAST KO (barras blancas) tratados con LPS (n= 10 ratones por cada grupo). ** $p < 0.01$. (B) Imagen histológica de parenquima pulmonar y espacios alveolares en ratones WT y FAST KO tratados con LPS. Los neutrófilos fueron teñidos de rojo y detectados con el sustrato cloroacetato esterasa (magnificación de 340 del original). La barra de la escala es de 10 μm . Figura adaptada de Simarro, 2010.

Esta reducción en el número de neutrófilos se debe a que FAST ejerce sus efectos proinflamatorios dentro del pulmón. Estos efectos proinflamatorios se observan cuando se cuantifican las citocinas TNF, IL6 e IL23A, las quimiocinas CXCL2 y KC en el lavado broncoalveolar como se observa en la **figura 19**. Sin embargo, los neutrófilos WT y FAST KO no presentan diferencias en: A. el número absoluto y relativo en sangre periférica; B. actividad quimiotáctica hacia el tejido infectado; C. supervivencia y apoptosis en el tejido infectado y D. producción de ROS. Por tanto, estos efectos proinflamatorios dentro del pulmón se deben a otras células presentes en el tejido que a través de la generación de ratones quiméricos se planteó que sean células hematopoyéticas presentes en el tejido previo a la infección como son los macrófagos alveolares y las células dendríticas (77).

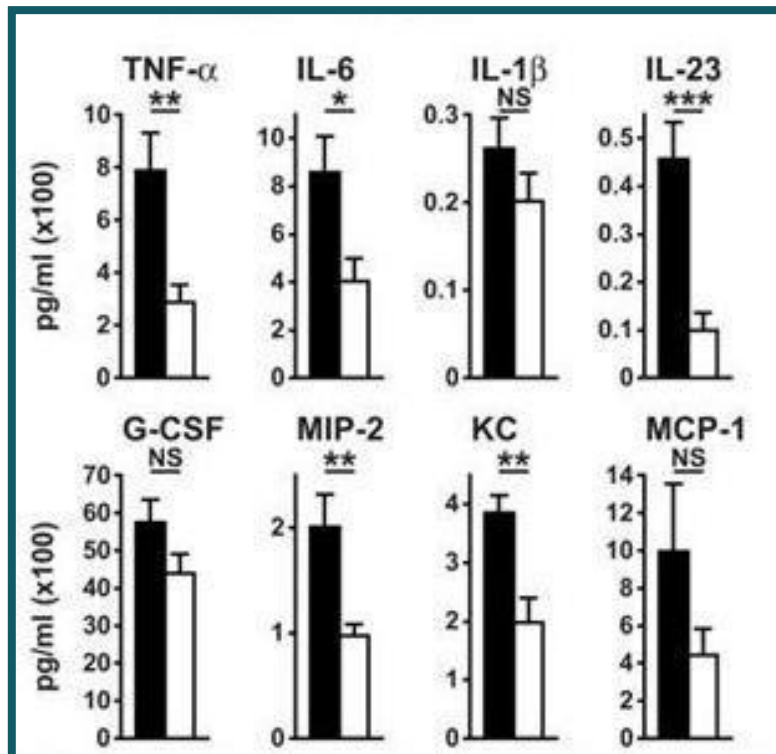


Figura 19: Niveles de citocinas y quimioatrayentes en el lavado broncoalveolar de ratones WT y FAST KO. Niveles de diferentes citocinas y quimioatrayentes en el lavado broncoalveolar de los ratones después de 20 horas de la instilación intranasal de LPS. Las barras negras representan a los ratones WT y las barras blancas representan a los ratones FAST KO. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Figura adaptada de Simarro, 2010.

También en otro modelo murino de artritis se observó que se producía menos inflamación articular, erosión ósea y del cartílago en ratones KO comparado con ratones WT (ver **figura 20**). Es posible que FAST contribuya con la patogénesis de la artritis al inhibir a TIA-1 que induce la represión de citocinas proinflamatorias (ver **figura 16**) (82).

Existen varios artículos que asocian la sobreexpresión o la baja expresión de FAST con diversos tumores malignos que comentamos a continuación:

Cáncer de páncreas: El adenocarcinoma ductal maligno de páncreas que representa el 90% de los tumores pancreáticos y el carcinoma mucinoso papilar intraductal presentan sobreexpresión de FAST en el análisis de inmunohistoquímica. Cuando se realiza el análisis de siRNAs con reducción de la expresión de FAST se observa que varios genes presentaron una disminución significativa en sus niveles de transcritos como son: MAPK3, MAPK12, MAPK13, PLAU, MMP9, BCL-2, EGFR, el protooncogen MET, IL6 y el antígeno carcinoembrionario (CEA), todos ellos conocidos por estar asociados con la agresividad clínica en el cáncer de páncreas (83).

Cáncer epitelial de ovario: Cisplatino es un quimioterápico usado en el cáncer epitelial de ovario que interfiere con la mitosis celular favoreciendo la apoptosis. Algunas líneas celulares tumorales como OVCAR-3 y SKOV-3 son resistentes al cisplatino. Sin embargo,

se ha descrito recientemente que la línea celular SKOV-3 sobreexpresa FAST cuando se administra cisplatino aumentando la apoptosis celular por un mecanismo no descrito (84).

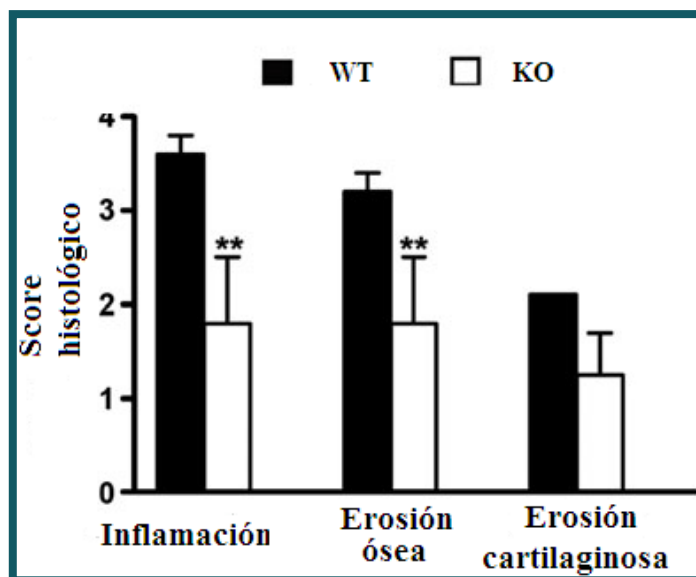


Figura 20: Evaluación histológica de un modelo murino de artritis. Score histológico de inflamación sinovial. Las barras negras representan a los ratones WT y las barras blancas representan a los ratones FAST KO ** $p < 0.01$. Figura adaptada de Simarro, 2015.

Astrocitoma: Los micro RNA (miRNAs) son cadenas de RNA endógenas no codificantes formadas por 19-24 nucleótidos los cuales modulan la expresión génica. Se ha descrito recientemente que el miR-106a-5p regula la expresión de FAST a través de un mecanismo postranscripcional y alterando la estabilidad de su mRNA. Pacientes con astrocitoma presentan bajos niveles de miR-106a-5p y ello favorece la sobreexpresión de FAST, el cual contribuye a un estado antiapoptótico en las células tumorales. El análisis de supervivencia de Kaplan Meier mostró que la baja expresión de miR-106a-5p y la elevada expresión de FAST se asocian con peor supervivencia en pacientes con astrocitoma (85).

Un artículo bastante interesante sobre FAST sea el publicado por Loh y colaboradores donde describen que en un modelo de regeneración de neuronas dopaminérgicas observaron que la ausencia de FAST incrementa la formación de neuritas, es decir, cualquier expansión del soma de una neurona, ya sea una dendrita o un axón en cultivos de células nerviosas inmaduras, ya que en estos cultivos es difícil distinguir el carácter de dendrita o axón de la proyección neuronal (86).

Aunque lo publicado hasta ahora se refiere principalmente a las funciones biológicas de FAST, aún quedan por aclarar muchos aspectos.

FASTKD1

La expresión de mRNA de FASTKD1 en los tejidos humanos experimentados se observa principalmente en corazón, cerebro, testículo y tiroides (ver **figura 15**). Se ha descrito que en pacientes con cáncer de endometrio presentan sobreexpresión de FASTKD1 en el

análisis de microarray (87). También se ha asociado la expresión génica de FASTKD1 en leucemia linfoblástica aguda con peor pronóstico clínico (88).

FASTKD2

La expresión de mRNA de FASTKD2 en los tejidos humanos analizados se observa principalmente en tiroides, grasa parda, corazón y ovario. En tejidos de ratones es llamativa la expresión de FASTKD2 en testículo, grasa parda y corazón (ver **figura 15**). Se ha descrito recientemente en dos hermanos una encefalomiopatía que se caracteriza por presentar retraso en el desarrollo, hemiplejía, convulsiones y atrofia asimétrica del cerebro; cuya fisiopatogenia se asoció a un descenso de la actividad de la citocromo C oxidasa en músculo esquelético y a una mutación del gen KIAA0971 que codifica la proteína FASTKD2 que localizan en la membrana interna mitocondrial. La mutación hallada en estos hermanos es homocigota y consiste en el cambio del nucleótido citosina por timina en la posición 1246, que cambia el codón original CGA por un codón de terminación TGA, a diferencia de sus padres que eran heterocigotos. Este cambio de codón provoca la finalización prematura de la proteína FASTKD2, por lo que se pierden 278 residuos de aminoácidos carboxilo terminal que incluyen dos dominios transmembrana y los dominios FAST_1 y FAST_2 como se observa en la **figura 21**. La función de FASTKD2 no pudo ser aclarada pero se sugirió que participa en la regulación de la producción de energía en las mitocondrias (89).

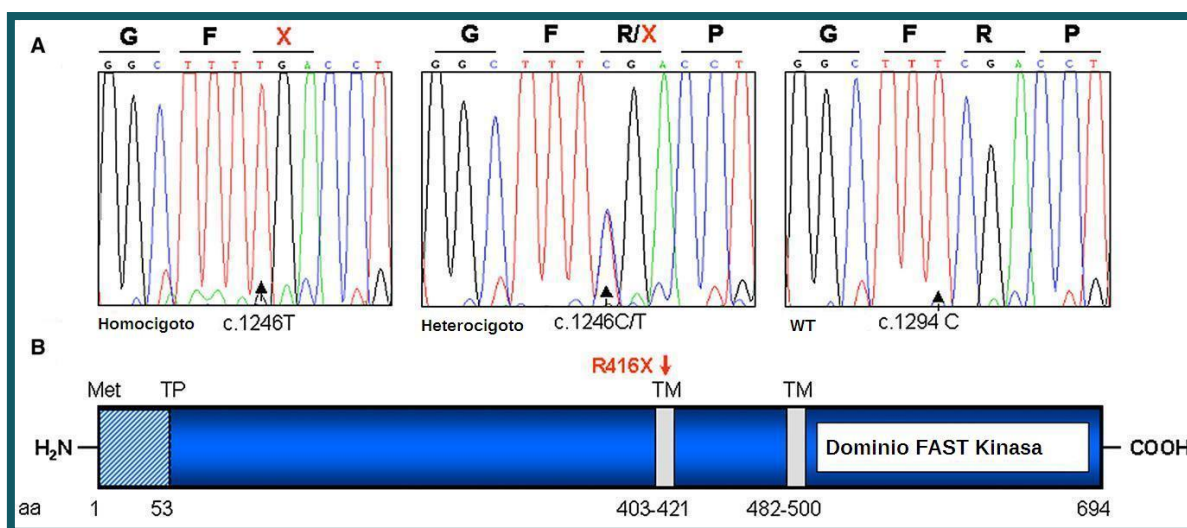


Figura 21: Características génicas de FASTKD2. (A) Análisis de la secuencia del exón 7 del gen KIAA0971 presentando el cambio en el c.1246C/T en los pacientes enfermos (homocigoto T), sus padres (heterocigotos C/T) y el control (homocigoto C). (B) Estructura esquemática de la proteína FASTKD2. TP indica el sitio de escisión; TM indica la ubicación de los dominios transmembrana. Una flecha roja indica la posición de la mutación R416X.

Otras mutaciones sin sentido de FASTKD2 han sido identificadas en un grupo de pacientes con ataxias hereditarias. Las variantes heterocigotas de FASTKD2 se producen por las mutaciones en c.149A4G:p.Lys50Arg, el cual está altamente conservado; y en c.-66A4G que predice modificaciones en el *splicing* alternativo del exón 1 (90).

En otro artículo se describe que los genes proapoptóticos FASTKD2 y BNIP3L y los genes antiapoptóticos TNFAIP8 y BCL2L2 se encontraron sobreexpresados en subcultivos de células madre provenientes de cordón umbilical humano. Plantean que se produce un equilibrio en la expresión de estos genes que permite que las células madre sobrevivan en los subcultivos. Proponen que FASTKD2 puede desempeñar un papel en la regulación de la apoptosis vía mitocondrial (91).

De modo similar, en otro artículo donde se realizan análisis de microarrays en líneas celulares de cáncer de mama detectan que el complejo DIF-1 reprime al gen FASTKD2, mediante inmunoprecipitación de la cromatina y así se previene la apoptosis de las células cancerígenas (92). Cuando DIF-1 es inactivado por NRIF3, se produce una desrepresión de FASTKD2 que provoca apoptosis aproximadamente unas 6-8 horas después de su expresión en células cancerígenas de cerebro y próstata (93).

Aparte de los hallazgos en enfermedades cancerígenas, también se están encontrando hallazgos en enfermedades degenerativas del sistema nervioso central. El Alzheimer se caracteriza por déficits en las tasas metabólicas cerebrales de glucosa en el giro congulado posterior y precúneo, décadas antes de la aparición de los déficits cognitivos medibles. Teniendo en cuenta el papel de los astrocitos en el almacenamiento de energía y la inmunidad del cerebro, se caracterizó el transcriptoma de los astrocitos y se identificó que FASTKD2 está poco expresado en Alzheimer (94). Otro estudio genómico descubrió una nueva asociación de un polimorfismo en el gen de FASTKD2 (rs7594645-G) con un mejor rendimiento de la memoria. Este efecto neuro protector muestra un mayor volumen del hipocampo, mayor densidad de materia gris y disminución de los niveles de los mediadores de apoptosis en el líquido cefalorraquídeo. Estos hallazgos plantean que FASTKD2 participa en la modulación de la neurodegeneración y sugieren mecanismos potenciales para las terapias para combatir la pérdida de memoria en el envejecimiento cognitivo normal y la demencia (95-96).

FASTKD3

La expresión de mRNA de FASTKD3 en los tejidos humanos analizados se observa principalmente en hígado, tiroides, cerebro, bazo, testículo y ovario (ver **figura 15**). En el 2010 se describió que FASTKD3 es una proteína mitocondrial esencial para la respiración celular, posiblemente a través de su interacción con proteínas implicadas en los complejos mitocondriales, sin alterar el ensamblaje de los supercomplejos mitocondriales (75).

FASTKD4

La expresión de mRNA de FASTKD4 en los tejidos humanos analizados se observa principalmente en grasa parda, corazón, testículo, cerebro e hígado (ver **figura 15**). Se ha descrito recientemente como FASTKD4 participa también en el funcionamiento génico mitocondrial (97).

FASTKD5

La expresión de mRNA de FASTKD5 en los tejidos humanos analizados se observa principalmente en grasa parda y corazón (ver **figura 15**). FASTKD5 también participa del funcionamiento génico mitocondrial del RNA (98).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el impacto de FAST en la capacidad fagocítica y bactericida de los macrófagos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar la capacidad de fagocitar bacterias de los macrófagos procedentes de ratones silvestre y los ratones deficientes en FAST.
2. Comparar la actividad bactericida de macrófagos procedentes de ratones silvestre y ratones deficientes en FAST.
3. Estudiar los mecanismos moleculares responsables de las diferencias observadas.
4. Evaluar si los resultados obtenidos en macrófagos de ratón son trasladables a los macrófagos humanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Los ratones C57BL/6 silvestre (WT) y ratones C57BL/6 deficientes en la proteína FAST (KO) son alimentados y mantenidos en jaulas estériles (4-5 ratones por jaula) en una habitación del animalario de la Facultad de Medicina de Valladolid con un ciclo de luz/oscuridad estándar (12 horas luz/12 horas oscuridad). Los ratones utilizados en todos los experimentos fueron de 8 a 12 semanas de edad con un promedio de peso de 18-20 g. Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo una campana de flujo laminar usando las precauciones asépticas. El uso de los ratones para esta Tesis Doctoral fue revisado y aprobado por el Comité de Ética en Experimentación y Bienestar Animal (CEEBA) de la Universidad de Valladolid.

Generación de ratones C57BL/6 deficientes en la proteína FAST

Se generaron ratones modificados genéticamente que carecen del gen que codifica FAST (FAST *knockout*, FAST KO) como se observa en la **figura 22**. El gen de FAST contiene 10 exones que abarcan 4,3 kb (ver **figura 22-A**). Se diseñó un vector dirigido para sustituir el gen FAST con un casete de expresión flanqueado por neo-loxP utilizando secuencias aisladas de las células derivadas del DNA genómico llamada W4/129S6 ES. Este vector se transfectó en las células W4/129S6 ES para seleccionar integrantes estables que se identificaron utilizando la técnica Southern blotting (ver **Anexo A4-B**) y PCR (ver **Anexo A4-C**). Los clones de células ES fueron inyectadas en los blastocistos de los ratones C57BL/6J (B6) para generar quimeras (ver **figura 22-B**). Después de la transmisión de la línea germinal se cruzaron con ratones hembras B6, luego la progenie resultante fueron criados con ratones transgénicos para eliminar el casete neo. Los ratones FAST KO se retrocruzaron con ratones B6 durante 12 generaciones. De los ratones FAST KO se prepararon fibroblastos para confirmar que no expresan mRNA de FAST (ver **Anexo A4-D**) o proteínas (ver **Anexo A4-E**) (77).

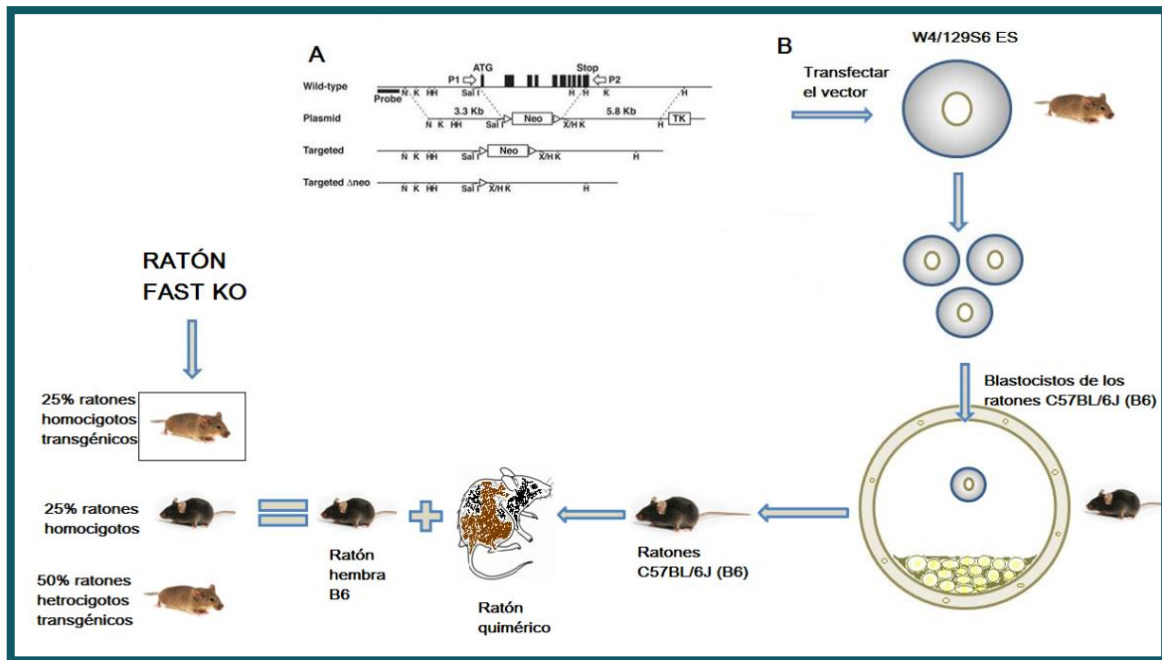


Figura 22: Generación de ratones FAST KO. (A) Estrategia génica utilizada. La elección correcta eliminó FAST, reemplazándolo con un casete flanqueado por neo-loxP. El casete se elimina mediante cruces con ratones EIIa-Cre. Los exones están indicados en cajas negras. E, Ecl 136II; H, HindIII; K, KpnI; N, NotI; neo, casete con el gen de resistencia a neomicina; SI, SacI; X, XhoI; Δ, sitio loxP. (B) Representación de los diferentes pasos para generar ratones FAST KO. Explicación en el texto.

Genotipado de los ratones

Se realizó el genotipado de los ratones C57BL/6 WT y ratones C57BL/6 FAST KO para confirmar su fenotipo (ver **figura 23**). Para ello se extrajo el DNA a partir de las colas de los ratones. Para la obtención de DNA genómico, las colas se incubaron en buffer de lisis (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, SDS 0,5%) con proteinasa K (300 µg/ml) durante 1 hora a 56°C. El DNA se precipitó añadiendo al lisado 600 µl de etanol absoluto y 20 µl de NaCl a 5M. Se incubó la mezcla durante 20 min a -20°C y se centrifugaron los viales a 15.000 rpm durante 20 minutos. Se retiró el sobrenadante y el DNA genómico precipitado se lavó con etanol al 70%. Se volvió a centrifugar y el pellet de DNA se resuspendió en un buffer Tris 10 mM, EDTA 1mM. El DNA se amplificó mediante 32 ciclos de PCR de 15 s a 95°C, 30 s a 58°C y 60 s a 72°C. Los ratones se genotiparon con los oligonucleótidos:

- WT sentido 5' GTGAATGACCTCAGGCTTAAC 3' y
- WT antisentido 5' AGAGAGCAGGATTCGAAGCAT 3' para amplificar el alelo WT
- KO sentido 5' CTCGAGGTCGACGGTATCGATA 3' y
- KO antisentido 5' AATCTTCACTGAGCGAGAAATG 3' para amplificar el alelo FAST KO.

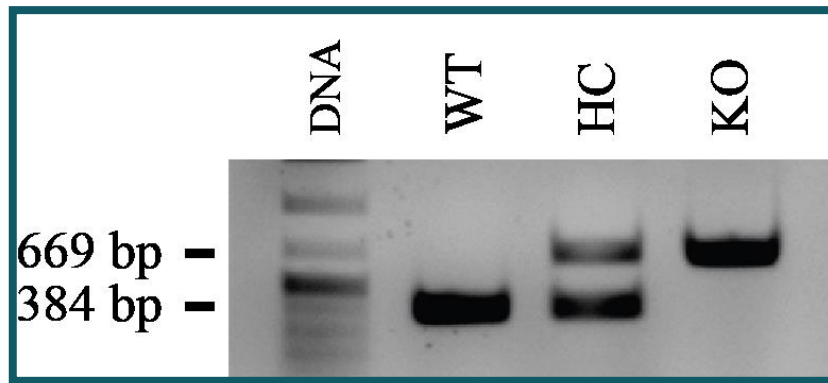


Figura 23: Genotipado de los ratones. Análisis de Northern de mRNA de DNA genómico de la cola de los ratones WT y FAST KO.

Cepas de Bacterias

Se utilizaron tres cepas bacterianas (dos cepas de bacilos gram negativos y una cepa de cocos gram positivos). *Escherichia coli* **DH5-a** y **BL21** provenían de Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, CA) y la cepa *Staphylococcus aureus* **Cowan 1** provenía de la American Type Culture Collection (ATCC 12598).

Obtención de macrófagos peritoneales

Los animales fueron estimulados con 2 ml del medio tioglicolato de Brewer estéril al 3% por vía intraperitoneal. Cinco días después, fueron anestesiados con isoflurano y sacrificados por dislocación cervical. Se colectó el exudado de células por lavado de la cavidad peritoneal con 8 ml de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) a 4°C. El exudado obtenido se centrifugó a 1200 r.p.m. durante 5 minutos; el pellet se resuspendió en 20 ml de medio completo: RPMI con Glutamax I (Gibco) con SFB al 10%, 100U/ml de penicilina G, y 100 µg/ml estreptomina (Gibco).

La viabilidad celular se evaluó por exclusión con azul de tripano (Sigma) y las células se contaron con una cámara de Neubauer utilizando un microscopio invertido Leica. La concentración celular se ajustó a 1×10^6 macrófagos/ml. Sembramos los macrófagos a una densidad de 2×10^6 macrófagos por pocillo suspendidas en 2 ml de medio completo en placas de 6 pocillos. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ durante 24 horas antes de realizar los experimentos.

Diferenciación de monocitos humanos a macrófagos

La línea celular **THP-1** procede de un varón de un año con leucemia monocítica aguda y las hemos empleado como modelo de monocitos humanos. Estas células presentan un comportamiento característico al ser activadas con 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) en virtud del cual adquieren características similares a los macrófagos: dejan de proliferar para producir citocinas proinflamatorias, se adhieren a las superficies de plástico de las placas de cultivo y son capaces de fagocitar microorganismos.

La línea celular THP-1 fue mantenida en el medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, GlutaMAX-1 y 2-mercaptoetanol (0.05 mM). Para diferenciar las células THP-1 a macrófagos, sembramos las células a una densidad de 250.000 células por pocillo suspendidas en 2 ml de medio completo con PMA a una concentración de 100 ng/ml (en placas de 6 pocillos). Las células se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ durante 72 horas.

Silenciamiento génico mediante RNA de interferencia

En los últimos años, el RNA de interferencia se ha convertido en una herramienta altamente específica y de gran potencia para silenciar genes diana. Nosotros hemos utilizado la tecnología de RNA interferente pequeño (**siRNA**) para silenciar la expresión de FAST en macrófagos derivados de células THP-1. Los siRNAs fueron obtenidos de Ambion (actualmente absorbida por Invitrogen) y son de tipo *Silencer Select*.

Los oligo *Silencer Select* representan una nueva generación de siRNAs diseñados por un nuevo algoritmo generado por Ambion que permite identificar las secuencias más potentes y asegurarse que son específicas para el gen diana. Además introduce modificaciones químicas (modificación *lock nucleic acid*, también llamada RNA inaccesible) que reducen los efectos secundarios de los siRNAs.

Los siRNAs usados fueron los siguientes:

- Control negativo catálogo 4390843
- FAST#1 corresponde a un oligo *Silencer Select* validado con catálogo s21478 proveniente de Ambion (Life Technologies Ltd, Paisley, UK).
- FAST#2 corresponde a un oligo *Silencer Select* validado con catálogo s21479 proveniente de Ambion (Life Technologies Ltd, Paisley, UK).

Ambos siRNAs se han obtenido de forma liofilizada y anillada, y se han resuspendido en agua libre de RNasas a una concentración de 10 µM. Para la transfección de los siRNAs usamos los reactivos de Lipofectamine® 2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación detallo el protocolo que hemos seguido:

Material y reactivos:

- “Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent” de Invitrogen.
- Medio Opti-MEM de Invitrogen sin antibióticos.
- Suspensión de siRNA.
- Medio de cultivo completo.

Procedimiento:

1. Transfectamos los macrófagos derivados de células THP-1 tras tratamiento con PMA. Las células THP-1 dejan de proliferar después del tratamiento con PMA por lo que

había una densidad aproximada de 250.000 células por pocillo (en placas de 6 pocillos) y las células estaban entre el 30-50% de confluencia, que es lo recomendado.

2. Lavamos dos veces los pocillos con 2 ml de medio completo para eliminar PMA y finalmente dejamos 2 ml de medio completo en cada pocillo. El medio completo había sido previamente precalentado a 37° C.
3. Diluimos 1,2 µl de cada siRNA con 200 µl de Opti-MEM.
4. En otro tubo mezclamos 2,5 µl de Lipofectamina 2000 con 200 µl de Opti-MEM. Esperamos 5 minutos.
5. Mezclamos el contenido de ambos tubos, agitamos y esperamos 20 minutos (no más de 30 minutos).
6. Añadimos 400 µl de la mezcla a cada pocillo de placa de 6. La concentración final del siRNA en cada pocillo era de 5 nM.
7. Homogeneizamos la suspensión moviendo la placa en cruz.
8. Esperamos 48 horas antes de realizar los experimentos.

Ensayo de Fagocitosis

Para estudiar la capacidad fagocítica de los macrófagos de ratones WT y ratones KO, así como la de los macrófagos derivados de células THP-1 en los que se ha silenciado la expresión de FAST respecto a las células control, se utilizó la técnica de citometría de flujo. El citómetro de flujo es un aparato que permite caracterizar e incluso separar diferentes poblaciones celulares *in vitro* mediante el uso de anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína frente a los marcadores de superficie específicos. La citometría de flujo permite utilizar varios fluorocromos a la vez. Las células marcadas pasan a través de un haz de un láser que detecta su capacidad para dispersar la luz y la fluorescencia que emiten. Para los ensayos de fagocitosis se realizó el siguiente protocolo:

Material y reactivos:

- Cepas bacterianas de *Escherichia coli* DH5α, *Escherichia coli* BL21 y *Staphylococcus aureus* Cowan 1
- Medio Luria-Bertani (LB)
- Medio RPMI 1640
- Tampón fosfato salino (PBS)
- Citómetro de flujo

Procedimiento:

Preparación de la suspensión bacteriana:

1. Se tomaron colonias individuales de las cepas bacterianas de interés, pasándolas a 2 ml de medio líquido LB, y se incubaron a 37° C en agitación (200 r.p.m.) durante 12 horas.
2. Se leyó la absorbancia a 600 nm de una dilución del cultivo bacteriano. Una densidad óptica de 1 equivale aproximadamente a 10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml.

Inactivación y tinción de la cepa bacteriana:

1. Se transfirieron el equivalente a 10^9 UFC de la cepa de interés en un tubo eppendorf de 1,5 ml estéril y se centrifugó la suspensión a 12000g durante 2 minutos a 4° C. Se eliminó el sobrenadante con ayuda de una pipeta dejando el pellet lo más seco posible y se resuspendieron las células en 1 ml de PBS. Centrifugamos de nuevo a 1.700 g durante 10 minutos a 4° C. Se repitió este lavado dos veces y se resuspendieron las células nuevamente en 1 ml de PBS.
2. Inactivamos las bacterias sometiéndolas a calor: 60 minutos a 80° C.
3. Centrifugamos la suspensión de bacterias inactivadas a 12.000 g durante 2 minutos y eliminamos el sobrenadante con ayuda de una pipeta.
4. Resuspendimos el pellet bacteriano en 1 ml de una solución FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a una concentración de 0,1 mg/ml en PBS y dejamos incubar a 37°C durante 30 minutos.
5. Centrifugamos de nuevo a 12.000 g durante 2 minutos y resuspendimos el pellet bacteriano en 1 ml de PBS. Se repitió este lavado 3 veces y se resuspendieron las bacterias inactivadas en PBS a una concentración de 1×10^{10} /ml para el ensayo de fagocitosis.

Se utilizaron también en los ensayos de fagocitosis cepas de *Escherichia coli* (DH5- α y BL21) genéticamente modificadas que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) que se obtuvieron mediante la introducción de un plásmido basado en pUC que lleva un gen GFP (resistente a la ampicilina) en bacterias químicamente competentes.

Ensayo de fagocitosis *in vitro*:

1. Agregamos 2 ml de RPMI 1640 de una suspensión de bacterias inactivadas y teñidas con FITC ó cepas que expresan GFP, equivalente a 100 bacterias por macrófago, a los cultivos de macrófagos murinos y de macrófagos derivados de THP-1. Los pocillos se habían lavado previamente dos veces con RPMI 1640.
2. Se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ durante 1 ó 2 horas.
3. Lavamos 3 veces los pocillos con 2 ml de PBS a 4 °C para eliminar las bacterias no ingeridas.
4. A continuación añadimos 1 ml de una solución azul de tripano al 4% (0.2 mg/ml) (Sigma) durante 1 minuto a cada uno de los pocillos para eliminar la señal de bacterias teñidas con FITC adheridas al macrófago que no han sido ingeridas.
5. Aspiramos la solución azul de tripano y lavamos 3 veces los pocillos con 2 ml de PBS para eliminar los restos de azul de tripano.
6. Despegamos con un raspador las células adheridas al plástico de los pocillos, las transferimos a un tubo de plástico y las fijamos con paraformaldehído al 3.7% en PBS.
7. Se realizó la lectura de los macrófagos en suspensión en el citómetro Gallios de Beckman Coulter. Las bacterias teñidas con FITC también se contaron en un microscopio de fluorescencia.

Para cuantificar con más precisión las posibles diferencias calculamos el **índice de fagocitosis** (phagocytic index, **PI**) que tiene en cuenta no sólo el porcentaje de células fagocíticas sino la intensidad de fluorescencia de las células positivas para FL-1. La intensidad de fluorescencia estima el número de bacterias fagocitadas. El PI se calculó con

la siguiente fórmula: $PI = \% \text{ de células positivas} \times \text{intensidad de fluorescencia de las células positivas}$. Las bolas de látex marcadas con fluoresceína se utilizaron como control de ingesta de partículas inertes. La fagocitosis también se comprobó mediante microscopía de fluorescencia.

Ensayo de fagocitosis *in vivo*:

1. Inyectamos a los ratones por vía intraperitoneal con 8×10^8 bacterias de *Escherichia coli* DH5- α teñidas con FITC.
2. Sacrificamos los ratones una hora después de la inyección intraperitoneal y se recolectaron muestras de lavado peritoneal.
3. Centrifugamos las muestras de lavado peritoneal, descartamos el sobrenadante y nos quedamos con las células peritoneales.
4. Lavamos 3 veces con 2 ml de PBS a 4 °C para eliminar las bacterias no ingeridas. A continuación añadimos 1 ml de una solución azul de tripano al 4% (0.2 mg/ml) (Sigma) durante 1 minuto para eliminar la señal de bacterias teñidas con FITC adheridas al macrófago que no han sido ingeridas.
5. Aspiramos la solución azul de tripano y lavamos 3 veces los pocillos con 2 ml de PBS para eliminar los restos de azul de tripano.
6. Fijamos los macrófagos con paraformaldehído al 3.7% en PBS.
7. Se realizó la lectura de los macrófagos en el citómetro Gallios de Beckman Coulter en el Servicio de Citometría de Flujo del Instituto de Biología y Genética Molecular. Los datos fueron analizados usando el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR). La intensidad de la fluorescencia se expresó en escala logarítmica.

Para cuantificar con más precisión las posibles diferencias calculamos el índice de fagocitosis que tiene en cuenta no sólo el porcentaje de células fagocíticas sino la intensidad de fluorescencia de las células positivas para FL-1. La intensidad de fluorescencia estima el número de bacterias fagocitadas. El PI se calculó con la siguiente fórmula: $PI = \% \text{ de células positivas} \times \text{intensidad de fluorescencia de las células positivas}$. Las bolas de látex marcadas con fluoresceína se utilizaron como control de ingesta de partículas inertes. La fagocitosis también se comprobó mediante microscopía de fluorescencia.

Ensayo de Protección con Gentamicina

La actividad bactericida de los macrófagos la estudiamos usando el ensayo de protección con gentamicina.

1. Cultivamos macrófagos inducidos por tioglicolato en placas de 24 pocillos a una concentración de 5×10^5 /pocillo, en triplicado por cada condición y tiempo.
2. Incubamos los macrófagos con las bacterias a razón de 10:1 (bacteria:macrófago) durante una hora a 37 °C para permitir la fagocitosis.
3. Después de la primera hora, añadimos gentamicina a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ para matar las bacterias extracelulares durante una hora.

4. A las dos horas reemplazamos el medio celular por otro medio fresco que contenía gentamicina a una concentración de 10 µg/ml.
5. A las 2, 6 y 24 horas pos-infección, los macrófagos los lavamos con PBS y los lisamos con 1 ml de agua estéril durante 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Cultivamos en agar Lennox-Bertani varias diluciones de la lisis celular e incubamos a 37 °C durante 24 horas.
7. Contabilizamos las colonias crecidas al finalizar la incubación.

Los recuentos bacterianos en los puntos tempranos del ensayo (2 horas) reflejan capacidad fagocítica. Los recuentos bacterianos en los tiempos 6 y 24 horas reflejan capacidad bactericida.

Ensayo de madurez celular

Se comparó la madurez celular de los macrófagos peritoneales de ratones WT y KO. Los macrófagos fueron teñidos con los siguientes anticuerpos conjugados que se muestran en la **tabla 6**:

Tabla 6: Anticuerpos conjugados utilizados en el ensayo de madurez celular.

Provenientes de BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ	
FITC-conjugado anti-CD80 (16-10A1)	FITC-conjugado anti-CD86 (GL1)
FITC-conjugado anti-CD40 (3/23)	FITC-conjugado anti-CD38 (90/CD38)
FITC-conjugado anti-CD14 (rmC5-3)	FITC-conjugado anti-CD206 (19.2)
APC-conjugado CD11b (M1/70)	Phycoerythrin (PE)-conjugado anti-rat Ig
Proveniente de AbDSerotec, Kidlington, UK	
(PE)-conjugado F4/80 (Cl:A3-1,)	
Provenientes de Thermo Scientific Pierce, Hampton, NH	
anti- TLR2 (6C2)	anti-TLR4 (MTS510)

Se realizó la lectura de los macrófagos en un citómetro Gallios de Beckman Coulter. Los datos fueron analizados usando el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR). La intensidad de la fluorescencia se expresó en escala logarítmica. El número de células presentes en cada muestra depende de la subpoblación estudiada, aunque al menos 10000 células fueron analizadas.

Ensayo de Producción de ROS

La producción de ROS se midió usando el reactivo fluorescente dihidroetidum (DHE; Sigma-Aldrich). Las células fueron teñidas con 2 microM de DHE durante 15 minutos a 37°C antes de los ensayos de fagocitosis.

Se realizó la lectura de los macrófagos en el citómetro Gallios de Beckman Coulter en el Servicio de Citometría de Flujo del Instituto de Biología y Genética Molecular. Los datos fueron analizados usando el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR). La intensidad de la fluorescencia se expresó en escala logarítmica. El número de células presentes en cada muestra depende de la subpoblación estudiada, aunque al menos 10000 células fueron analizadas.

Evaluación por real time PCR del silenciamiento de FAST mediante siRNA

Se utilizó la técnica de PCR a tiempo real para cuantificar la cantidad que se expresó de un determinado mRNA en la célula en un momento concreto. Brevemente, la técnica consiste en amplificar una secuencia específica del mRNA que se quiere valorar y hacer un seguimiento a tiempo real de la amplificación. Esto se consigue, retrotranscribiendo el mRNA de la célula a cDNA previamente a la PCR, y durante ésta, hacer un seguimiento de la reacción midiendo la fluorescencia emitida, que se obtiene al incorporar reactivos a la mezcla de la reacción que se unen específicamente a la secuencia amplificada (sondas) o bien cuando se intercalan en el DNA de doble cadena (SYBR-Green).

La cuantificación puede ser absoluta o relativa. En la primera se determina el número de copias del mRNA valorado, usando como recta patrón un DNA que contiene el fragmento de DNA amplificado a diferentes concentraciones. En la segunda se determina la expresión del RNA valorado en relación a un RNA constitutivo cuya expresión no varía en las condiciones experimentales. En esta tesis Doctoral, las cuantificaciones que se han realizado son relativas, se han referido a la expresión de los genes 18S y β -actina, y se han realizado usando el sistema SYBR Green. Seleccionamos estos genes normalizadores tras aplicar la función applet de GeNORM a un conjunto extenso de genes constitutivos. El análisis se realizó con el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Material y reactivos:

- TRIzol (Invitrogen)
- Nanodrop (Thermo Scientific)
- Kit de retrotranscripción (BioRad)
- Mezcla SYBR Green (Applied Biosystems)
- Aparato Lightcycler 480 (Roche)

Procedimiento:

Extracción de RNA:

1. Usamos TRIzol para la extracción de RNA según las instrucciones del producto.
2. Añadimos 1 ml de TRIzol por cada 5×10^5 células y pipeteamos la muestra.
3. Incubamos la muestra homogeneizada durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos.
4. Añadimos 0,2 ml de cloroformo por cada ml de TRIzol. Agitamos los tubos vigorosamente durante 15 segundos y los incubamos a temperatura ambiente durante 2 o 3 minutos.

5. Centrifugamos las muestras a 12.000 g durante 15 minutos a 4° C. Las muestras se separan en dos fases donde el RNA se encuentra en la fase superior o acuosa.
6. Transferimos la fase acuosa a un tubo nuevo. Precipitamos el RNA de la fase acuosa mezclándola con isopropanol. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos y centrifugamos a 12.000 g durante 10 minutos a 4° C. El precipitado de RNA, generalmente invisible, forma un pellet en el fondo del tubo.
7. Quitamos el sobrenadante con ayuda de una pipeta. Lavamos el pellet con etanol al 75% añadiendo al menos 1 ml por cada ml de TRIzol usado. Mezclamos la muestra en el vórtex y centrifugamos a 7.500 g durante 5 minutos a 4° C.
8. Secamos brevemente el pellet de RNA (al aire por 5-10 minutos). Disolvemos las muestras de RNA en agua libre de DNAsas y RNAsas.
9. El RNA se cuantificó utilizando el Nanodrop a una absorbancia de 260 nm. Un valor de OD₂₆₀=1 es equivalente a 40 µg/ml de RNA.

Obtención de cDNA a partir de RNA:

Nosotros utilizamos un kit de BioRad que incluye una mezcla de cebadores inespecíficos: oligonucleótidos polidT que hibrida con las secuencias poliA de los mRNAs y oligonucleótidos degenerados que idealmente permiten la retrotranscripción de todo el RNA. Procedimos según las instrucciones del producto:

1. En un tubo de PCR mezclamos:
 - 0,5 µg de RNA total
 - 4 µl de un buffer 5x que incluye los oligonucleótidos cebadores
 - 1 µl de retrotranscriptasa
 - H₂O hasta completar 10 µl
2. A continuación realizamos la síntesis de cDNA en dos etapas:
 - 5 minutos a 25° C
 - 30 minutos a 42° C
 - Finalmente 5 minutos a 85° C para inactivar la retrotranscriptasa.

Amplificación y detección de DNA mediante PCR a tiempo real:

El diseño y elección de unos correctos cebadores (oligos/primers) para amplificar los genes que queríamos valorar es fundamental para una eficiente cuantificación de su expresión mediante PCR a tiempo real usando el reactivo SYBR Green. Para el diseño de cebadores hemos usado el programa “PrimerQuest” del paquete “SciTools” de “Integrated DNA Technologies”. Estas son las secuencias de los cebadores usados:

- FAST sentido: 5' CAGCAGCAAGGTGGTACAGA 3'
- FAST antisentido: 5' CGACGCACAATCAGAGCATG 3'
- 18S sentido: 5' TCAACTTTCGATGGTAGTCGCCGT 3'
- 18S antisentido: 5' TCCTTGGATGTGGTAGCCGTTTCT 3'
- Beta actina sentido: 5' ACCAACTGGGACGACATGGAGAAA 3'

- Beta actina antisentido: 5' TAGCACAGCCTGGATAGCAACGTA 3'

Usamos la mezcla de SYBR Green siguiendo las instrucciones del producto: las amplificaciones se hicieron en un volumen final de 25 μ l por pocillo de placa de 96 pocillos:

- 5 μ l del cDNA a una concentración final en el pocillo de 10 ng de equivalentes de RNA/ μ l
- 12,5 μ l de una mezcla de SYBR Green (2x)
- 1 μ l de una mezcla de cebadores sentido y antisentido (cada uno a una concentración de 10 pmol/ μ l)
- H₂O hasta completar 25 μ l

La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones:

- 1 ciclo de 10 minutos a 95° C
- 40 ciclos de:
 - 15 segundos a 95° C
 - 30 segundos a 60° C
 - 40 segundos a 72° C

Una vez finalizada la amplificación se realizaron las curvas de fusión para cada pocillo para descartar amplificaciones inespecíficas o formación de dímeros de cebadores.

Evaluación por Western blot del silenciamiento de FAST mediante siRNA

El análisis Western blot permite la identificación de una proteína separada por electroforesis mediante un anticuerpo que la reconoce específicamente.

En primer lugar se obtuvieron extractos proteicos y los separamos en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Después se transfirieron las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa de manera que quedaron inmovilizadas. Una vez transferidas, esta membrana se incubó con el anticuerpo primario específico para FAST y su presencia se reveló con un segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa que, en presencia de sustrato, generó un producto luminiscente.

Obtención de extractos proteicos

Material y reactivos:

- Tampón de lisis RIPA: NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7,4, SDS al 0,1%, ácido deoxicólico al 1%, Nonidet P-40 al 1%, inhibidores de proteasa (cóctel de inhibidores de proteasas de Sigma)

Procedimiento:

1. Partimos de macrófagos derivados de células THP-1 adheridos al plástico de pocillos de placas de cultivo de 6 pocillos. Lavamos cada pocillo dos veces con PBS.

2. Recogimos las células con la ayuda de una rasqueta y las transferimos a un tubo eppendorf en hielo. Centrifugamos y resuspendimos el pellet celular en 100 µl de solución de lisis RIPA por cada $2,5 \times 10^5$ células.
3. Dejamos que se complete la homogeneización de la muestra, dejando los tubos en hielo durante 30 minutos.
4. Centrifugamos los eppendorf durante 30 minutos a 4° C a máxima velocidad en una centrífuga de mesa.
5. Recogimos el sobrenadante que contenía las proteínas solubilizadas en otro tubo limpio y descartamos la fracción no solubilizada que está en el pellet.
6. Congelamos las muestras a -80° C hasta su uso.

Electroforesis en gel de poliacrilamida sds-page

Material y reactivos:

- Tampón de carga Laemmli x4 (LSB x4): Tris-HCl (pH 6,8) 200 mM, dodecilsulfato sódico (SDS) al 8%, glicerol al 40%, azul de bromofenol al 4%, ditiotreitól a 100 mM.
- Solución acrilamida-bisacrilamida (30%-0,8%)
- Gel concentrador o *stacking* gel: acrilamida/bisacrilamida al 3,3%, Tris-HCl (pH 6,8) 125 mM, SDS a 0,1%, persulfato amónico (APS) a 0,1%, TEMED a 6,6 mM.
- Gel separador o *running* gel: acrilamida/bisacrilamida al 10%, Tris-HCl (pH 8,8) 375 mM, SDS a 0,1%, APS a 0,1%, TEMED a 2,2 mM.
- Tampón de electroforesis: Tris-Base 25 mM, Glicina 250 mM, SDS al 0,1%.
- Marcador de tamaño molecular preteñido (Fisher Scientific).
- Miniprotean (BioRad).

Procedimiento:

1. Polimerización de los geles: Montamos los vidrios del sistema de electroforesis según las instrucciones del fabricante. Preparamos el gel separador y se vertió entre los vidrios. Depositamos una capa de isopropanol para nivelar el gel separador. Una vez polimerizado el gel separador, se decantó el isopropanol y se añadió el gel concentrador. Inmediatamente se sumergió el peine y se dejó que polimerice a temperatura ambiente.
2. Preparación de las muestras: en un tubo eppendorf se depositaron 15 µl del lisado celular (equivalente a 40.000 células) y 5 µl de LSB x4. Se mezclaron y se hirvieron las muestras a 95° C durante 5 minutos y se centrifugaron a 12.000 g durante 30 segundos a temperatura ambiente.
3. Electroforesis: Cargamos las muestras y los marcadores en el gel. Fijamos el voltaje a 150 V y se corrió durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para análisis por Western blot.

Análisis Western blot

Material y reactivos:

- Tampón de transferencia: Tris-base a 25 mM, Glicina a 192 mM, Metanol al 10%.
- Membrana de nitrocelulosa (BioRad).

- Papel Whatmann 3MM.
- Mini-Protean TransBlot Cell (BioRad).
- Solución de bloqueo y de incubación para los anticuerpos primario y secundario: Tris base 20 mM, NaCl 150 mM, suero de caballo normal al 5%.
- Tampón de lavado: Tris base a 20 mM, NaCl a 150 mM, Tween-20 a 0,1% (pH 7,6).
- Anticuerpo primario: policlonal de cabra contra FAST (Santa Cruz, sc 1820) y anticuerpo monoclonal de ratón frente a β actina (Sigma).
- Anticuerpo secundario: policlonal de burro contra anticuerpo de cabra acoplado a peroxidasa de rábano picante (HRP) (Santa Cruz).
- Reactivo ECL: este reactivo permite la detección de anticuerpos conjugados con HRP debido a que la peroxidasa cataliza una reacción química que produce un sustrato luminiscente (Amersham).
- Películas de revelado.

Procedimiento:

Transferencia:

1. Después de la electroforesis descartamos el gel concentrador y el gel separador se sumergió en el tampón de transferencia.
2. Preparamos una bandeja que contenía 500 ml de tampón de transferencia en la que se hizo el montaje. Sobre la parte negra colocamos por este orden: esponja, un papel Whatmann, el gel, la membrana de nitrocelulosa, un papel Whatmann y una esponja.
3. Cerramos el soporte y se colocó en una cubeta de transferencia orientando la parte negra del soporte hacia el polo negativo de manera que las proteínas migren del gel a la membrana al desplazarse hacia el polo positivo.
4. Llenamos la cubeta de tampón de transferencia y aplicamos una corriente constante de 100 V durante 1 hora. Una vez acabada la transferencia desmontamos el sistema y se separó la membrana.

Inmunodetección:

1. Preincubamos la membrana con la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente o durante 12 horas a 4° C.
2. A continuación incubamos la membrana con el anticuerpo primario diluido (1:1000) en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación orbital. Posteriormente se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno con tampón de lavado.
3. Después incubamos la membrana con el anticuerpo secundario conjugado con HRP diluido (1:5000) en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación orbital. Tras la incubación, se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno con tampón de lavado.
4. Se eliminaron los restos de tampón de lavado y se añadió 4 ml de reactivo de ECL. Después de un minuto se limpiaron los restos del reactivo ECL y las proteínas se detectaron con una exposición a un film autorradiográfico.

Análisis estadístico y gráficos

Los resultados se presentaron como medias \pm error estándar de la media de, como mínimo, tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student utilizando el Software Microsoft Office Excel 2010. También se utilizó Microsoft Office Excel 2010 para analizar los resultados de la PCR a tiempo real. Los valores se consideraron significativos cuando $p < 0,05$.

* valor $p < 0,05$

** valor $p < 0,01$

*** valor $p < 0,001$

Los gráficos fueron realizados usando el software GraphPad Prisma 5, Adobe Photoshop 6.0 y Adobe Illustrator CS3.

RESULTADOS

RESULTADOS

Ausencia de FAST provoca incremento de la fagocitosis en macrófagos peritoneales.

El primer paso fue determinar si la ausencia de FAST tiene impacto en la capacidad fagocítica de los macrófagos. Para probarlo, expusimos macrófagos peritoneales WT y KO, activados con tioglicolato, a las bacterias *Escherichia coli* (DH5- α y BL21) y *Staphylococcus aureus* Cowan 1 marcadas con fluoresceína. La fagocitosis se midió por citometría de flujo y se comparó con partículas inertes de latex marcadas con fluoresceína.

Como se muestra en la **figura 24-A**, el análisis revela que el porcentaje de fagocitosis de ambas cepas de *Escherichia coli* fue más alto en macrófagos KO que en macrófagos WT. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la actividad fagocítica frente a *Staphylococcus aureus* y partículas de latex marcadas con FITC entre macrófagos WT y macrófagos KO.

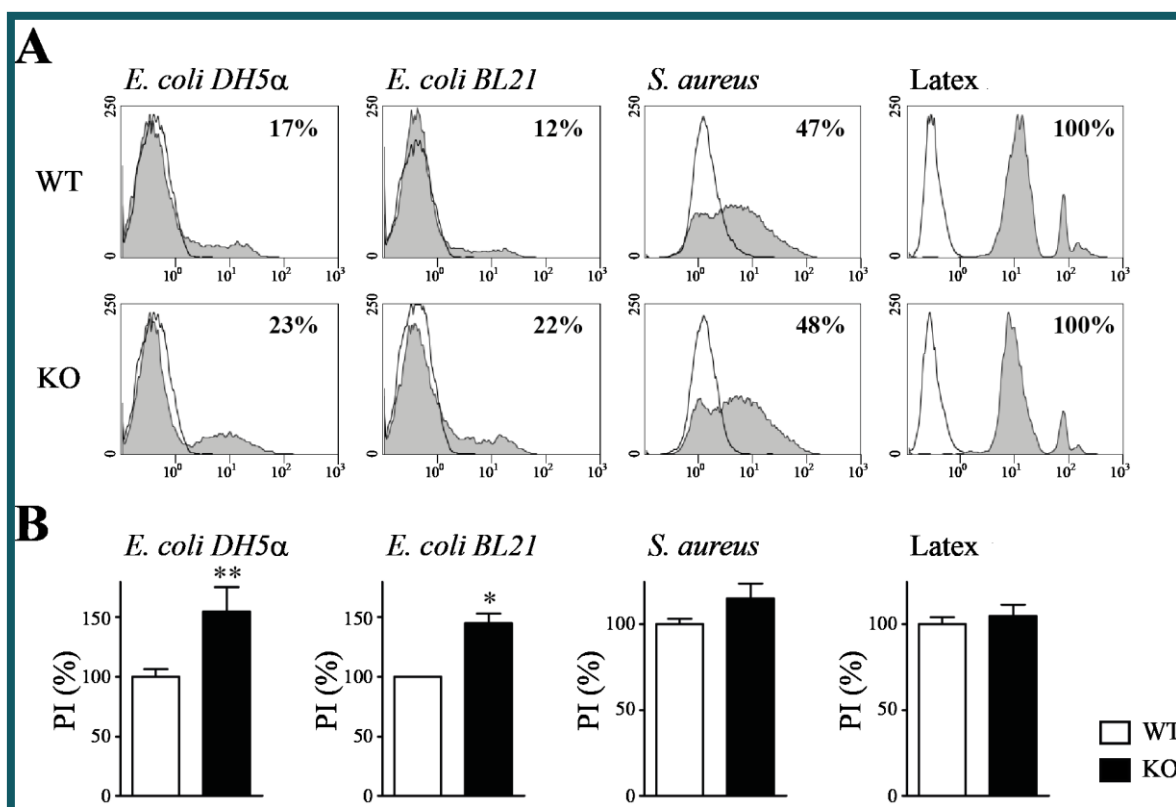


Figura 24: Fagocitosis de *Escherichia coli* DH5- α , *Escherichia coli* BL21, *Staphylococcus aureus* Cowan 1 y partículas de latex en macrófagos WT y KO. (A) Citometría de flujo de la fagocitosis. Los datos son representativos de 6 experimentos independientes. Se representaron los macrófagos incubados con bacterias teñidas con FITC o partículas de latex teñidas con FITC con un histograma coloreado de gris y los macrófagos no tratados con una línea negra sin relleno. (B) El índice fagocítico (PI) fue calculado multiplicando el porcentaje de macrófagos positivos con la media de intensidad de fluorescencia de los macrófagos positivos. Las barras blancas representan a los ratones WT y las barras negras representan a los ratones KO. Se representa la media \pm SEM (fueron 6 experimentos independientes). El PI fue normalizado con un control, que consistió en fijar al 100% los promedios de los ratones WT. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

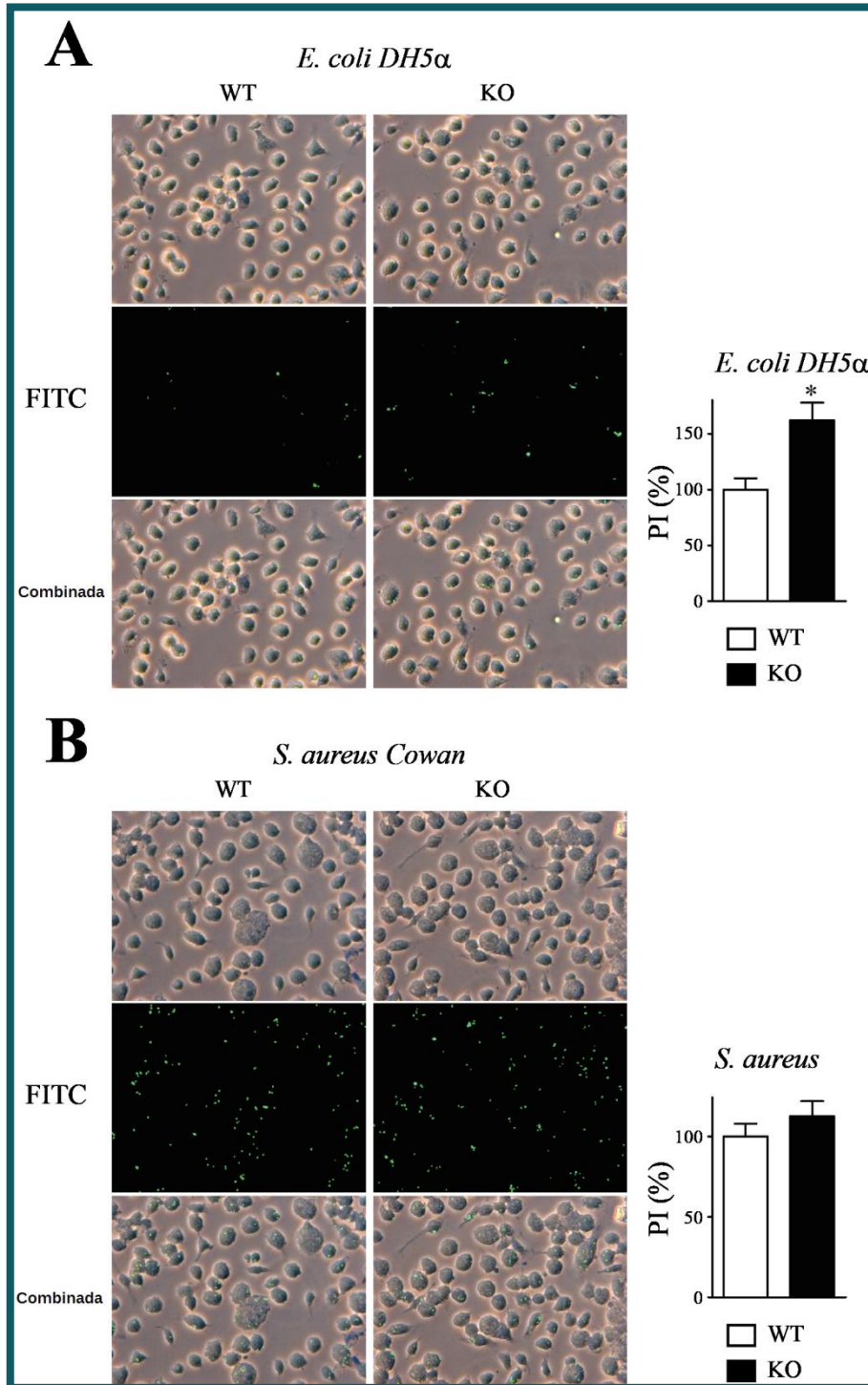


Figura 25: Fagocitosis de *Escherichia coli* DH5- α y *Staphylococcus aureus* Cowan 1 en macrófagos WT y KO. Imágenes representativas que ilustran la fagocitosis de *Escherichia coli* DH5- α teñida con FITC (A) ó *Staphylococcus aureus* Cowan 1 teñida con FITC (B) por los macrófagos WT y KO. Las imágenes individuales y combinadas están presentadas a un aumento de 40x. El PI está representado en los paneles de la derecha. El PI fue calculado multiplicando el porcentaje de macrófagos que contienen al menos una bacteria con la media del número de bacterias dentro de los macrófagos. Las barras blancas representan a los ratones WT y las barras negras a los ratones KO. Se representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. El PI fue normalizado con un control de los promedios de los ratones WT. * $p < 0.05$.

Después, calculamos el índice normalizado de fagocitosis (PI), el cual es un promedio de los porcentajes de las células fagocíticas y la intensidad de fluorescencia de las células positivas, para cuantificar con más precisión las diferencias. El PI de los macrófagos KO y WT presentan diferencias significativas como se muestra en la **figura 24-B**. El PI de *Escherichia coli* DH5- α fue significativamente mayor en macrófagos KO comparado con WT ($154 \pm 21\%$ versus 100% , $p < 0.01$). De forma similar, el PI de *Escherichia coli* BL21 estaba incrementado en macrófagos KO comparado con WT ($144 \pm 8\%$ versus 100% , $p < 0.05$). El PI para *Staphylococcus aureus* Cowan 1 fue ligeramente superior en macrófagos KO comparado con WT ($115 \pm 9\%$ versus 100% , $p = 0,343$). EL PI de las partículas de latex fue similar en ambos grupos de macrófagos.

También cuantificamos la fagocitosis de bacterias marcadas con FITC a través de la observación en un microscopio de fluorescencia como se muestra en la **figura 25**. El PI de *Escherichia coli* DH5- α estaba incrementado en macrófagos KO comparado con WT a las 2 horas ($162 \pm 15\%$ versus 100% , $p = 0,035$). Nuevamente, el PI de *Staphylococcus aureus* Cowan 1 fue ligeramente superior en macrófagos KO comparado con WT ($113 \pm 9\%$ versus 100% , $p = 0,365$) aunque sin significación estadística.

La actividad bactericida de los macrófagos es independiente de FAST

A raíz de los hallazgos experimentales previos, nos propusimos estudiar la actividad bactericida de los macrófagos KO usando el ensayo de protección con gentamicina. Como se muestra en la **figura 26-A** a las 6 y 24 horas post-infección, el número de bacterias supervivientes fue similar en macrófagos KO y WT. Estos datos demuestran que la actividad bactericida no está alterada en macrófagos KO.

En contraste con esto, a las 2 horas post-infección, el número de bacterias *Escherichia coli* (DH5- α y BL21) que sobreviven al ensayo de protección con gentamicina fue más elevado en macrófagos KO comparado con macrófagos WT en *Escherichia coli* DH5- α (2805 ± 373 C.F.U./well versus 1495 ± 121 C.F.U./well, $p = 0,016$) y *Escherichia coli* BL21 (2315 ± 335 C.F.U./well versus 1543 ± 96 C.F.U./well, $p < 0.05$). El número de colonias de *Staphylococcus aureus* vivos fue ligeramente superior pero no estadísticamente significativo en macrófagos KO comparado con macrófagos WT (157134 ± 18291 C.F.U./well versus 124248 ± 24078 C.F.U./well, $p = 0,296$). Estos hallazgos obtenidos sobre el número de bacterias vivas a las dos horas del ensayo de protección con gentamicina se correlacionan bien con la capacidad fagocítica.

La actividad bactericida a las 24 horas fue corroborada al medir la producción de radicales de oxígeno (ROS) en macrófagos WT y KO cuando se expusieron a *Escherichia coli* DH5- α . Como se muestra en la **figura 26-B**, la producción de ROS que se midió con el promedio de la fluorescencia, fue similar en ambos grupos de macrófagos. De forma similar no se observaron diferencias significativas en los niveles basales de ROS entre ambos grupos de macrófagos. Estos hallazgos indican que la capacidad intracelular de matar las bacterias gram negativas es independiente de la presencia de FAST.

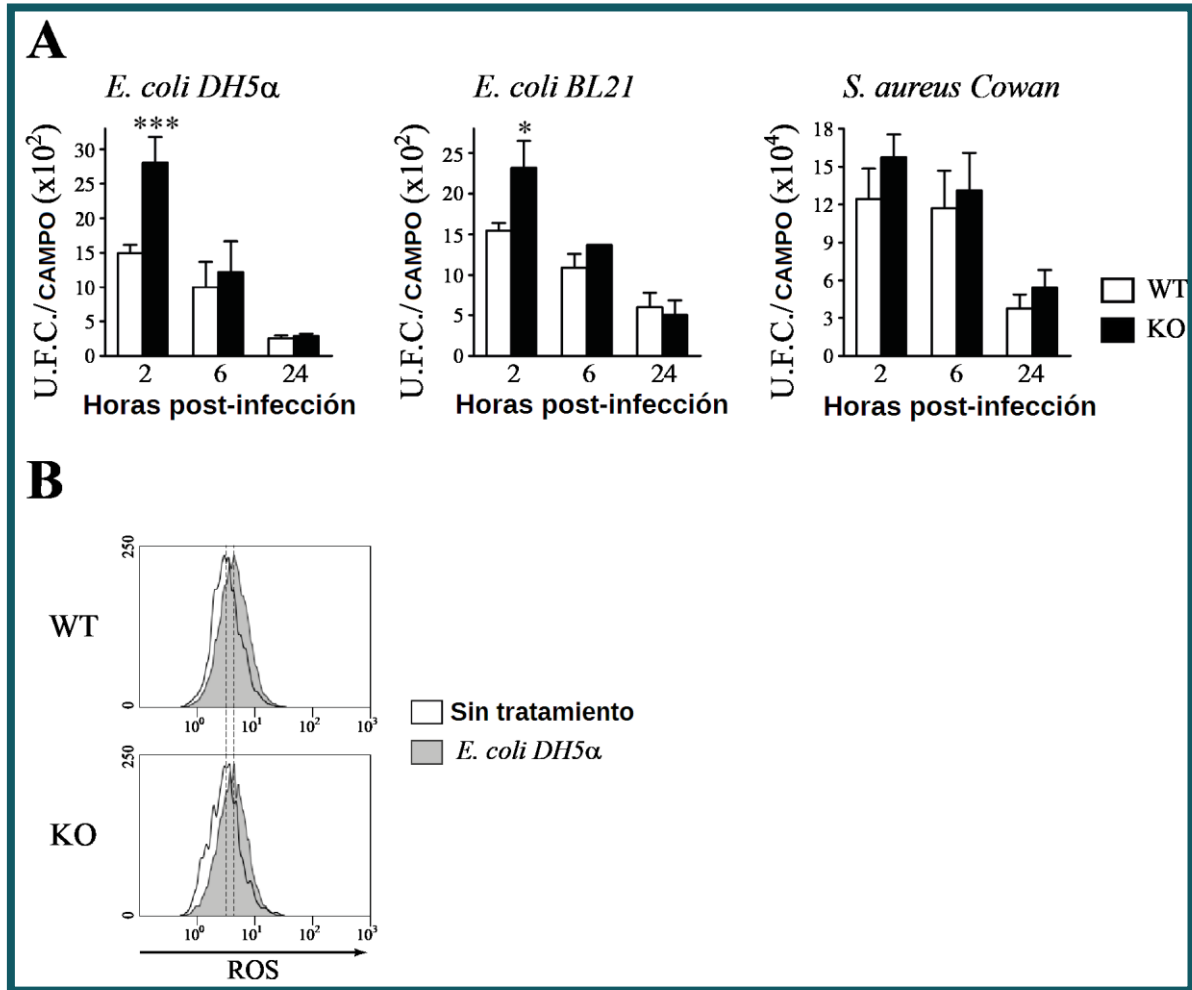


Figura 26: Supervivencia de *Escherichia coli* DH5- α , *Escherichia coli* BL21 y *Staphylococcus aureus* Cowan 1 dentro de los macrófagos KO y WT. (A) La actividad bactericida se midió utilizando el ensayo de protección con gentamicina. Se representó el número de UFC/campo ($\times 10^2$) de *Escherichia coli* DH5- α , *Escherichia coli* BL21 y el número de UFC/campo ($\times 10^4$) de *Staphylococcus aureus* Cowan 1 recuperadas a las 2, 6 y 24 horas post-infección. Las barras blancas representan a los ratones WT y las barras negras a los ratones KO. Se representa la media \pm SEM de más de 6 experimentos independientes. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$. (B) La producción de ROS se midió por citometría de flujo utilizando el tinte dihidroetidum. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes. Los macrófagos no tratados se representan con una línea negra sin relleno y los macrófagos infectados con las bacterias teñidas con FITC se representan con un histograma coloreado de gris.

Los macrófagos KO tienen aumentado el contenido de la proteína F-actina durante la fagocitosis

Para comenzar a identificar como FAST afecta la fagocitosis de los macrófagos, nosotros examinamos el contenido de F-actina, la expresión de TLR2, TLR4 y los marcadores de superficie de maduración celular como son: CD11b, CD80, CD86, CD40, CD38, CD14 y CD206. Una posible explicación se basaba en que la ausencia de FAST podía incrementar la expresión de TLR y con ello facilitar la interacción de estos receptores celulares con los antígenos bacterianos aumentando la fagocitosis celular.

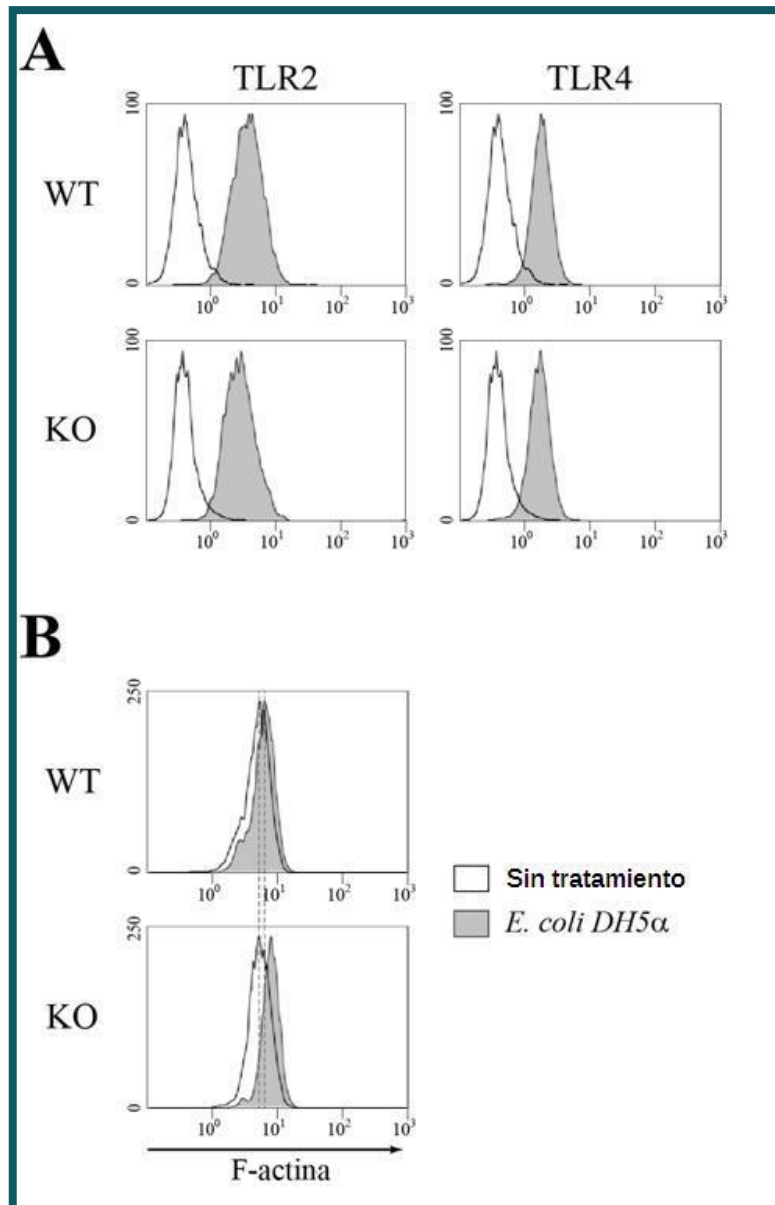


Figura 27: Citometría de flujo de la expresión de TLR2, TLR4 y el contenido de F-actina. (A) Los macrófagos peritoneales de ratones WT y KO fueron analizados por citometría de flujo para evaluar la expresión de TLR2 y TLR4 en macrófagos F4/80+. Los marcadores de superficie celular teñidos se representan con un histograma coloreado de gris y los no teñidos con una línea negra sin relleno. Los histogramas son representativos de tres experimentos independientes utilizando macrófagos peritoneales estimulados con tioglicolato en grupos de tres ratones por experimento. (B) Macrófagos peritoneales de ratones WT y KO se analizaron por citometría de flujo para evaluar el contenido de F-actina. Se representan los macrófagos no tratados con una línea negra sin relleno y los macrófagos infectados con bacterias teñidas con FITC se representan con un histograma coloreado de gris.

Otra posible explicación del aumento de la capacidad fagocítica de los macrófagos sin FAST se basaba en que se produjeran defectos en la maduración celular. Como se observa en la **figura 27-A**, nosotros descartamos diferencias en la expresión de los receptores TLR2 y TLR4 entre los macrófagos WT y KO. También descartamos defectos en la maduración celular entre los macrófagos WT y KO ya que la expresión de los marcadores de superficie celular son similares como se observa en la **figura 28**.

Sin embargo, como se observa en la **figura 27-B**, nosotros observamos que la ausencia de FAST se acompaña de un incremento en el contenido de la proteína F-actina durante la fagocitosis.

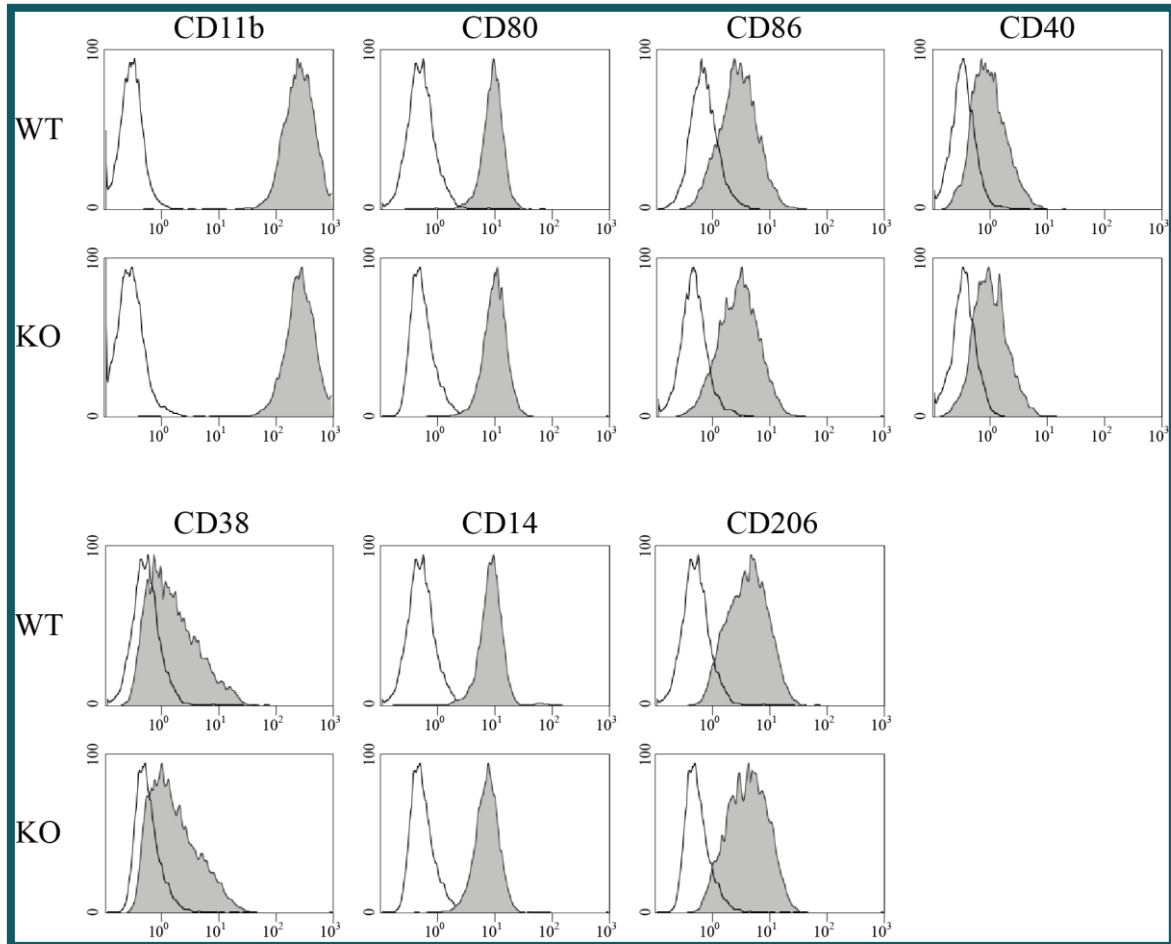


Figura 28: Citometría de flujo de los marcadores de superficie celular en los macrófagos WT y KO. Los macrófagos peritoneales de los ratones WT y KO fueron analizados por citometría de flujo para evaluar la expresión de los marcadores de superficie celular expresado en macrófagos F4/80+. Los marcadores de superficie celular teñidos se representan con un histograma coloreado de gris y marcadores de superficie celular no teñidos se representan con una línea negra sin relleno. Los histogramas son representativos de tres experimentos independientes utilizando macrófagos peritoneales estimulados con tioglicolato en grupos de tres ratones por experimento.

La ausencia de FAST también provoca incremento de la fagocitosis en macrófagos peritoneales *in vivo*

Después de demostrar que los macrófagos KO tiene mayor capacidad fagocítica que los macrófagos WT *in vitro*, nosotros exploramos si también ocurre *in vivo*. Para este propósito, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con *Escherichia coli* DH5- α teñidos con FITC. El grado de fagocitosis de los macrófagos *in vivo* fue cuantificado por citometría de flujo. Como se muestra en la **figura 29**, los macrófagos peritoneales KO son más eficientes para fagocitar *Escherichia coli* que los macrófagos WT *in vivo*. El proceso

de fagocitosis actuó de manera más eficiente *in vivo* que *in vitro*. Tomados en conjunto, los resultados indican que la ausencia de FAST causa un incremento de la habilidad fagocítica de ambos macrófagos tanto *in vitro* como *in vivo*.

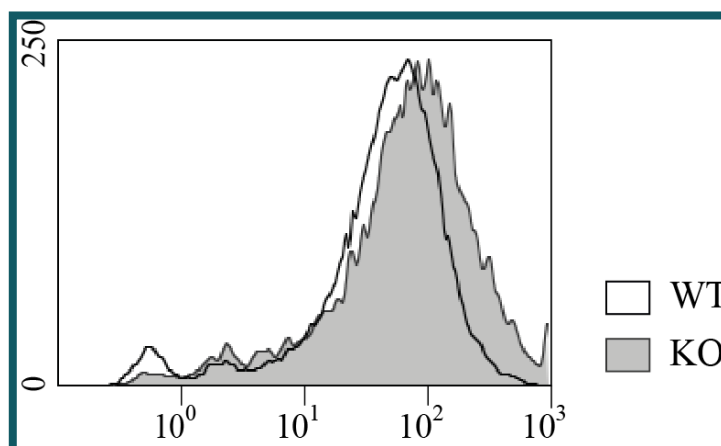


Figura 29: Fagocitosis de *Escherichia coli* por macrófagos peritoneales *in vivo*. Los ratones WT y KO fueron inyectados por vía intraperitoneal con *Escherichia coli* DH5- α teñida con FITC. Una hora más tarde, los macrófagos peritoneales fueron recolectados y analizados por citometría de flujo. Los macrófagos se identificaron en las células CD11b F4/80. Los histogramas son representativos de tres experimentos independientes utilizando grupos de tres ratones por experimento. Los macrófagos KO se representan con un histograma coloreado de gris y macrófagos WT se representan con una línea negra sin relleno.

Papel de FAST en la capacidad fagocítica de los macrófagos humanos

Para demostrar el papel de FAST en la capacidad fagocítica de los macrófagos humanos fue necesario realizar dos pasos previos que consistieron en: A. Diferenciación de los monocitos humanos THP-1 en macrófagos. B. Silenciamiento de FAST mediante siRNA.

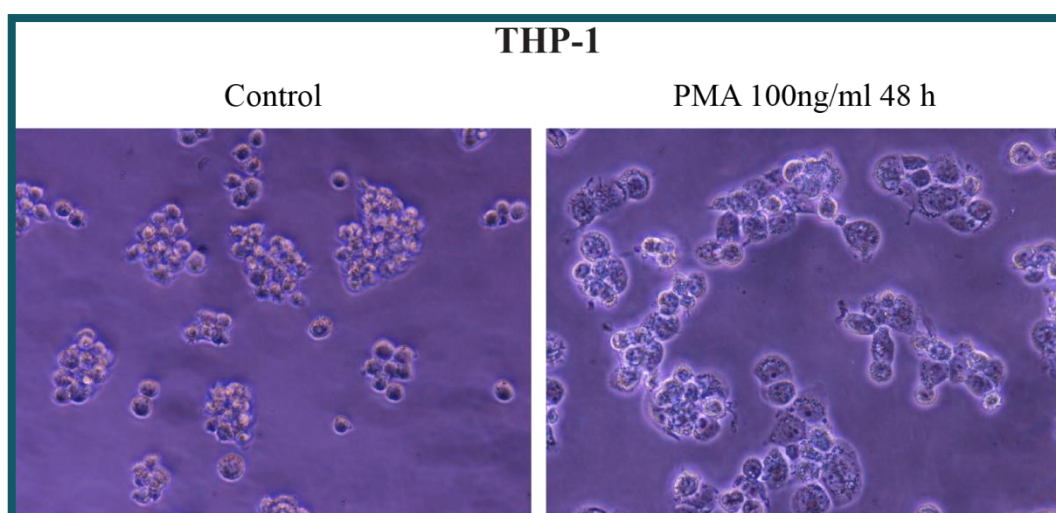


Figura 30: Diferenciación de THP-1 humano en macrófagos usando PMA. Imágenes representativas que ilustran los monocitos humanos THP-1 (Control) y los macrófagos después de incubarlos con PMA a una concentración de 100 ng/ml durante 48 horas. Las imágenes están presentadas a un aumento de 40X.

La diferenciación de los monocitos THP-1 en macrófagos se realizó al incubarlos con PMA a una concentración de 100 ng/ml durante 72 horas (ver **figura 30**). Como se puede observar los macrófagos aumentan de tamaño y dejan de proliferar a diferencia de las células control.

El silenciamiento de FAST mediante siRNA en los macrófagos se realizó a través de la transfección de dos siRNAs a una concentración de 5 nM durante 48 horas. Los dos siRNAs reducen la transcripción de mRNA al 50% como se demuestra por PCR a tiempo real (ver **figura 31**).

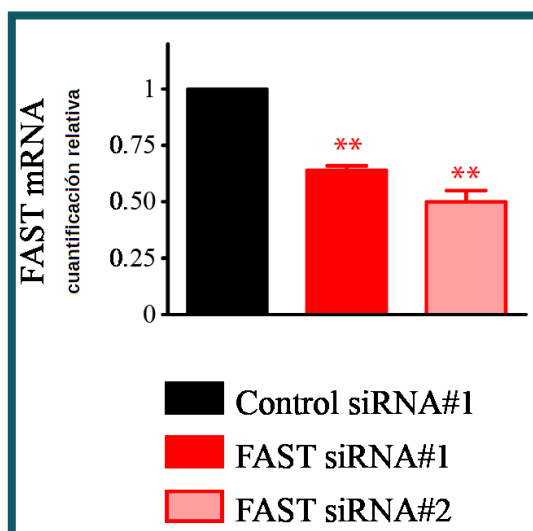


Figura 31: Niveles relativos de mRNA de FAST en macrófagos humanos transfectados con siRNA. Experimento representativo de más de tres realizados por PCR a tiempo real. La barra negra representa a los macrófagos humanos sin siRNA. La barra roja a los macrófagos transfectados con siRNA#1 y la barra rosa a los macrófagos transfectados con siRNA#2. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

La reducción de la transcripción del mRNA conlleva que la síntesis de proteínas también esta afectada como se demuestra en el análisis de transferencia de Western blot que se observa en la **figura 32**. Los macrófagos humanos transfectados con siRNA#1 presentan ésta disminución de la síntesis de proteína FAST. En la figura también se observan dos formas de FAST. La banda superior de 60 KDa se corresponde a la forma extramitocondrial de FAST. La banda inferior de 50 KDa se corresponde a la forma intramitocondrial de FAST. FAST tiene una secuencia de localización mitocondrial que se corta por una peptidasa en el interior de la mitocondria. La β actina es utilizada como control de carga. Después de demostrar el silenciamiento de FAST en los macrófagos humanos, nosotros realizamos los ensayos de fagocitosis con *Escherichia coli* DH5- α y BL21 teñidos con FITC.

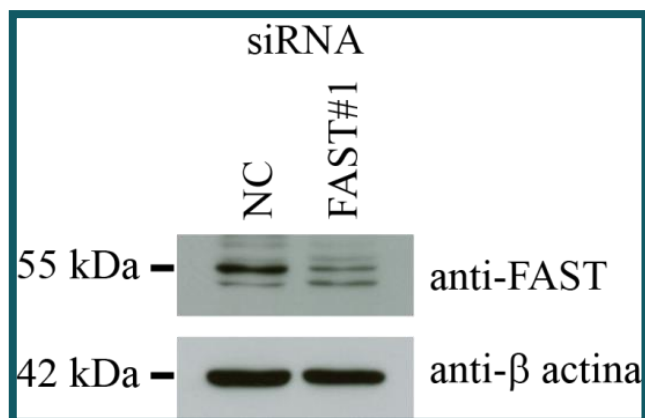


Figura 32: Análisis de transferencia de Western blot de extracto de proteínas de macrófagos humanos transfectados con siRNA#1. Los macrófagos humanos transfectados con siRNA#1 se comparan con macrófagos humanos no transfectados con siRNA (NC: control negativo). La β actina es utilizada como control de carga.

Como se esperaba, el silenciamiento de FAST con ambos siRNAs (FAST siRNA#1 y FAST siRNA#2) incrementa la tasa de fagocitosis comparado con macrófagos humanos tratados con siRNA de control (ver **figura 33-A**). Como se observa en la **figura 33-B**, el PI de *Escherichia coli* DH5- α está significativamente incrementado en los macrófagos humanos con silenciamiento de FAST comparado con los macrófagos tratados con siRNA de control (FAST # 1 $133 \pm 3\%$ versus 100% , $p < 0.05$; FAST # 2 $136 \pm 3\%$ versus 100% , $p < 0.05$). De forma similar, el PI de *Escherichia coli* BL21 también se incrementa en los macrófagos humanos con silenciamiento de FAST comparado con los macrófagos tratados con siRNA de control (FAST # 1 $129 \pm 4\%$ versus 100% , $p < 0.05$; FAST # 2 $127 \pm 3\%$ versus 100% , $p < 0.05$). Estos resultados demuestran que FAST es un regulador negativo de la fagocitosis de *Escherichia coli* en macrófagos humanos y de ratones.

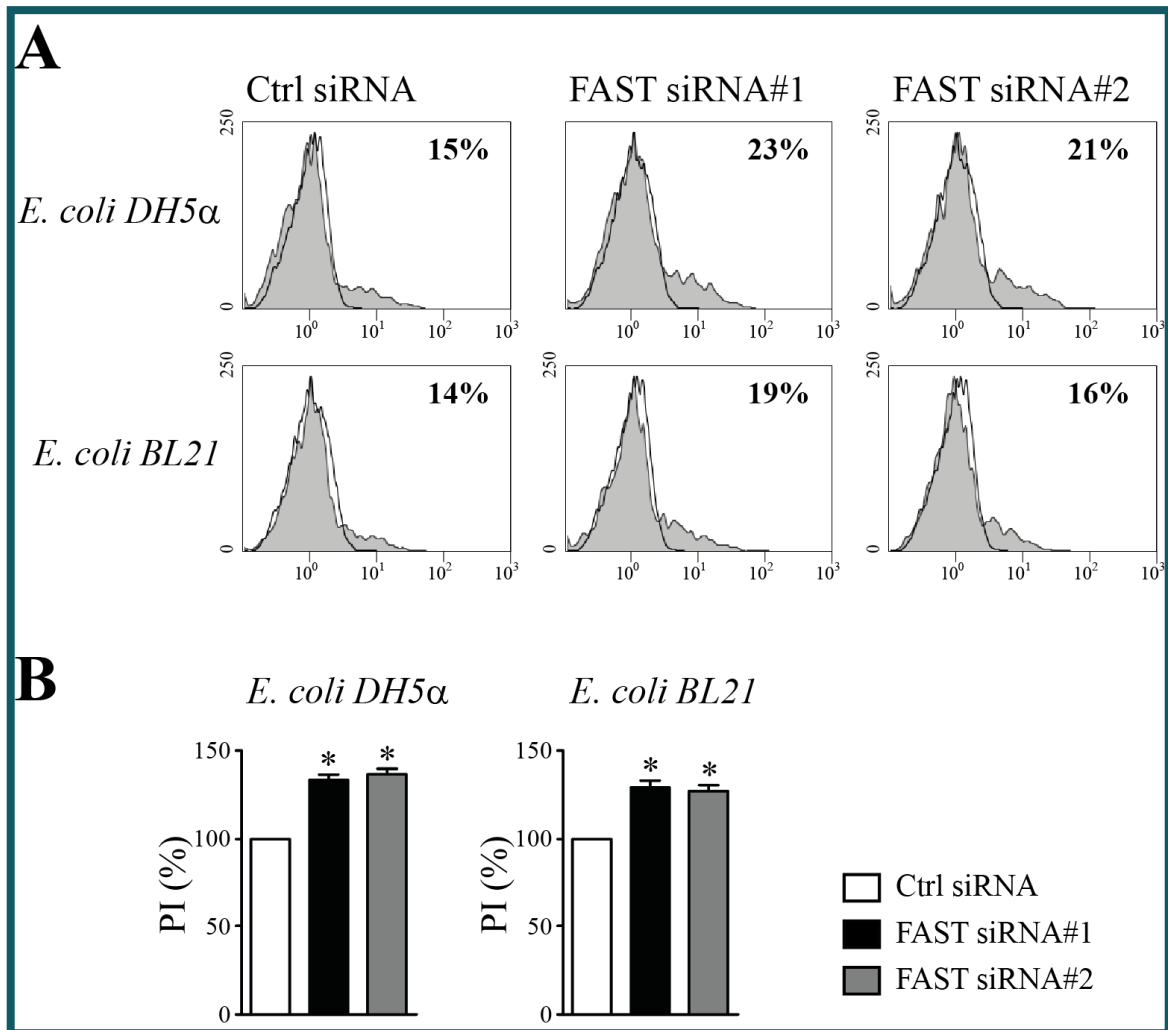


Figura 33: Fagocitosis de *Escherichia coli* DH5- α y *Escherichia coli* BL21 en macrófagos humanos con silenciamiento de FAST. La expresión de FAST fue silenciada en macrófagos humanos derivados de THP-1 usando dos diferentes siRNAs frente a FAST (#1 y #2). (A) Citometría de flujo representativa de fagocitosis en más de tres experimentos independientes. Los macrófagos humanos fueron tratados con los siRNAs a 5 nM durante 48 horas seguido de una incubación durante 2 horas con *Escherichia coli* DH5- α ó *Escherichia coli* BL21 teñidas con FITC. Los macrófagos que se sometieron al ensayo de fagocitosis se representan con un histograma coloreado de gris y los macrófagos no tratados se representan con una línea negra sin relleno. (B) El PI de *Escherichia coli* DH5- α y *Escherichia coli* BL21 fue calculado multiplicando el porcentaje de macrófagos positivos con la media de la intensidad de fluorescencia de los macrófagos positivos. Las barras blancas representan a las células tratadas con el control siRNA, las barras negras a las células tratadas con KO siRNA # 1 y las barras grises a las células tratadas con KO siRNA # 2. Se representa la media \pm SEM de más 3 experimentos independientes. El PI fue normalizado con el control, que consistió en fijar al 100% los promedios de las células control. * $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La presente Tesis Doctoral revela un nuevo papel de FAST en la regulación de la fagocitosis Fc-independiente. La descripción de esta nueva familia de proteínas mitocondriales, cuyo prototipo es FAST, es bastante reciente. Los primeros artículos científicos fueron publicados a partir de 1995. Sin embargo, es desde el 2007 que se ha avanzado mucho en la comprensión de las funciones moleculares y celulares. Para ello, se generaron previamente ratones sin el gen FAST y se describió en el año 2010 que la proteína FAST es un componente clave en la respuesta inmune innata (77). En un modelo de daño pulmonar agudo por lipopolisacárido, los ratones que carecían de FAST mostraron una reducción en la infiltración de neutrófilos y en las concentraciones de citoquinas y quimioquinas en el lavado broncoalveolar. El análisis de quimeras de médula ósea sugería que las células responsables del fenotipo eran células residentes en pulmón de origen hematopoyético. Más tarde, en experimentos realizados *in vitro* se sugirió que los macrófagos alveolares de los ratones FAST KO eran las células responsables del fenotipo inflamatorio de los mismos (resultados no publicados). Además, se encontró que FAST está sobreexpresado en células mononucleares en sangre periférica de pacientes asmáticos y pacientes con enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y esclerosis múltiple (80), (81). Así que, todos estos datos sugieren que FAST es un importante regulador de diversas funciones en la línea celular macrofágica.

Una función característica de los macrófagos, como su nombre lo indica, consiste en fagocitar una gran variedad de restos celulares propios y extraños. Los macrófagos se derivan de los monocitos y actúan en los tejidos para eliminar todos aquellos restos que se producen durante cualquier proceso inflamatorio sea de origen infeccioso, tóxico, autoinmune o traumático. Los macrófagos poseen varios tipos de receptores para poder interactuar con una gran variedad de proteínas, lípidos y carbohidratos. Estos receptores son capaces de identificar bacterias, virus, hongos, células infectadas, células muertas o incluso eliminar residuos tóxicos para los tejidos. Además cuentan con un citoesqueleto desarrollado para facilitar la formación de fagosomas y abundantes mitocondrias que aportan toda la energía necesaria. Así que, los macrófagos tienen un papel destacado en la inmunidad innata y en la defensa frente a patógenos. Por tanto, era necesario dilucidar el posible efecto de FAST en esta función primordial y así abrir nuevas rutas de investigación para esclarecer los mecanismos biológicos.

AUSENCIA DE FAST Y FAGOCITOSIS EN MACROFAGOS MURINOS Y HUMANOS

Los resultados experimentales de esta Tesis Doctoral demuestran que la ausencia de FAST en macrófagos murinos y humanos aumenta la actividad fagocítica frente a bacterias. Aunque no se ha demostrado experimentalmente, es posible que la fagocitosis de otras partículas o restos celulares también este aumentado.

La fagocitosis es un proceso dinámico en el cual los diversos componentes celulares (membrana citoplasmática, receptores, mediadores intracelulares, citoesqueleto, mitocondrias) participan activamente en las diferentes fases (1. Quimiotaxis, 2. Adherencia y opsonización, 3. Ingestión y vacuolización, 4. Digestión). Este proceso dinámico es bastante complejo y todavía no se ha logrado elaborar un único modelo que pueda explicar por completo el proceso de internalización de patógenos. Esta complejidad es en parte debida a la diversidad de receptores capaces de estimular la fagocitosis como se observa en la **figura 8** y en parte debido a la enorme variedad de microorganismos.

La fagocitosis en los macrófagos es un proceso diverso; las señales que conducen a la polimerización de actina (**figura 9**) y la internalización de partículas dependen de los receptores específicos que median el proceso y señales modificadoras adicionales que pueden ser generadas por partículas complejas. Las partículas complejas, tales como bacterias, pueden activar múltiples receptores cuyas vías de señalización pueden interactuar de forma intrincada. Además algunas bacterias vivas tienen la capacidad de modificar vías de señalización dentro de las células eucariotas como se ha demostrado en *Mycobacterium tuberculosis* (99) ó *Salmonella typhimurium* (100). Por tanto, cualquier modificación en la célula macrofágica podría alterar esta función celular. Se ha avanzado mucho en el conocimiento del papel que juegan en la fagocitosis muchos de los componentes celulares. Sin embargo, aún existen aspectos por aclarar y profundizar y esta Tesis Doctoral da un paso más en este sentido. Para ello vamos a desgranar los resultados de nuestros experimentos.

Obtención de macrófagos murinos para fagocitosis *in vitro*

A menudo se utiliza la inyección de tioglicolato intraperitoneal como un agente estimulante de la acumulación de macrófagos a nivel peritoneal. Este estímulo tiene la ventaja de reclutar un gran número de células al sitio de la inflamación, pero no aumenta la actividad microbicida de los macrófagos y por lo tanto no los activa. Los macrófagos obtenidos con este método se comportan de forma similar a los residentes en tejido en cuanto a su capacidad de fagocitosis de bacterias opsonizadas. El tamaño y número de los macrófagos así estimulados aumenta progresivamente hasta alcanzar un máximo a los 5 días post-inyección con una mínima contaminación por granulocitos, los cuales podrían obstaculizar los ensayos (101). Por todo ello los experimentos de fagocitosis *in vitro* se han hecho con macrófagos intraperitoneales murinos obtenidos 5 días después de la inyección de tioglicolato.

Obtención de macrófagos humanos a partir de THP-1

Para la obtención de macrófagos humanos inducimos la diferenciación de los monocitos a macrófagos mediante PMA siguiendo las recomendaciones de cultivo de la *American Type Culture Collection* (ATCC), agencia depositaria y distribuidora de lotes controlados de la línea celular THP-1.

Las THP-1 al ser activadas con PMA adquieren características similares a los MDM como son: aumento del radio nuclear, aumento del número de mitocondrias y lisosomas, resistencia a estímulos apoptóticos, presencia de marcadores de superficie de diferenciación celular similares y alta capacidad fagocítica (63). En presencia de >5ng/ml de PMA, alrededor del 90% de las células THP-1 se adhieren y adquieren una morfología macrófaga. Esta morfología no presenta diferencias significativas usando PMA a diferentes dosis entre 5 y 100 ng/ml.

Para la aparición en las células de mRNA de CD14, un marcador de macrófagos, se requiere un tiempo mínimo de 48 horas en medio de diferenciación (64). Puesto que nuestros experimentos de fagocitosis requerían células ya diferenciadas, decidimos emplear una concentración de 100 ng/ml de PMA durante 72 horas (ver **figura 30**).

La transfección de los macrófagos así obtenidos se llevó a cabo con siRNA de Invitrogen siguiendo un protocolo basado en R. Dhiman y sus colaboradores en su publicación de 2008 (102) y optimizado con las recomendaciones del fabricante de lipofectamina. La comprobación de la eficiencia del silenciamiento se llevó a cabo examinando tanto el mRNA específico como la correspondiente proteína. En los dos casos se demostró una reducción del 50% de los niveles normales presentes en las células tratadas con siRNA-FAST en comparación con un siRNA control negativo (ver **figura 31** y **figura 32**).

Fagocitosis *in vivo* e *in vitro*

La respuesta de los macrófagos a bacterias completas se considera fisiológicamente más relevante que la que ocurre a diversos extractos purificados de las mismas (103). Por ello los experimentos se llevaron a cabo con bacterias enteras teñidas con FITC, que fueron inactivadas por calor. La extinción de la fluorescencia derivada de las bacterias no fagocitadas se llevó a cabo mediante azul tripano, por lo que se analizaron sólo las bacterias que fueron sido internalizadas y se cuantificaron utilizando la citometría de flujo.

Se realizaron varios experimentos de fagocitosis tanto *in vivo* (ver **figura 29**) como *in vitro* en macrófagos murinos (ver **figura 24** y **figura 25**) y en macrófagos humanos (ver **figura 33**). El proceso de fagocitosis actuó de manera más eficiente *in vivo* que *in vitro*, lo cual puede estar relacionado con la presencia de opsoninas o reactantes de fase aguda como LBP. LBP es una proteína soluble que se sintetiza principalmente en el hígado y se une al LPS para favorecer su reconocimiento por parte de CD14 y TLR4 (25), (104).

Expresión de receptores TLR2 y TLR4

Es importante demostrar que las diferencias en la capacidad fagocítica entre los macrófagos KO y WT no pueden atribuirse a una diferencia en la expresión de los receptores como son los TLR2 y TLR4. Estos receptores presentan un papel destacado en la interacción con bacterias. En efecto, se exploró la expresión de TLR2 y TLR4 en los macrófagos humanos mediante citometría de flujo, y no se apreció una diferencia significativa en ninguno de ellos cuando se compararon células tratadas con siRNA con

células control sin tratar. Los macrófagos murinos tampoco mostraron diferencias como se observa en la **figura 27-A**.

Maduración de los macrófagos

También es importante descartar que las diferencias no se deban a modificaciones en el proceso de maduración de los macrófagos. La madurez celular se estudia analizando y comparando los perfiles de expresión de determinados marcadores celulares, los cuales son:

1. **CD40**: es un miembro de la superfamilia de receptores TNF y es esencial para la mediación de una amplia variedad de respuestas inmunes e inflamatorias (105).
2. **CD80**: es un receptor de membrana que está activado al unirse a CD28. La activación del receptor induce la producción de citoquinas (106), (107).
3. **CD86**: es una proteína de membrana tipo I que es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Esta proteína es el ligando de dos proteínas de la superficie celular de las células T: el CD28 con el cual contribuye a la activación de las células T (108) y CTLA-4 con el cual inhibe la activación de las células T y disminuye la respuesta inmune (109).
4. **CD11B (Itgam)**: es un canal de la integrina α M. Las integrinas son proteínas de membrana heterodímeras compuestas por un canal *alpha* y un canal *beta*. La integrina α M β 2 es importante en la adherencia de los monocitos para estimular al endotelio y también para estimular la fagocitosis (110).
5. **CD38**: es una enzima multifuncional expresada en una gran variedad de células y tejidos en especial en leucocitos y macrófagos. CD38 participa en la adhesión celular y en la señalización intracelular (111).
6. **CD14**: es un antígeno de superficie expresado tanto en monocitos y macrófagos que coopera con otras proteínas para mediar la respuesta inmune frente al lipopolisacárido (112).
7. **CD206 (MRC1)**: el reconocimiento de complejas estructuras de carbohidratos en las glicoproteínas es un paso importante en diversos procesos biológicos como el reconocimiento intercelular y la neutralización de patógenos. CD206 es un receptor de membrana tipo I que favorece la endocitosis de glicoproteínas. Este receptor se une a estructuras de manosa en la superficie de potenciales patógenos bacterianos, virales o fúngicos y así pueden ser neutralizados por fagocitosis (113).

En nuestros experimentos se demostró que los patrones de expresión de estos marcadores de superficie de los macrófagos WT y KO eran similares (**figura 28**) y por tanto no hay defectos en su desarrollo. En la bibliografía científica publicada hasta ahora, tampoco se encontró evidencia que la alteración en la madurez celular provocará modificaciones en la capacidad fagocítica y en sus diferentes procesos. Los macrófagos murinos utilizados provenían de ratones adultos, de tal manera que su sistema inmune es maduro también. Así que el aumento de fagocitosis en ausencia de FAST es independiente de su estado madurativo.

Además queremos destacar que aunque hay diferencias genéticas, fenotípicas y de maduración entre los macrófagos murinos y los macrófagos derivados de la línea celular THP-1 conocidas, el fenotipo de la fagocitosis en ausencia de FAST se conserva.

FAGOCITOSIS DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS

En el proceso dinámico de la fagocitosis, las bacterias tienen también un papel destacado que es necesario profundizar. La interacción entre el macrófago y la bacteria, durante el proceso de la fagocitosis, es también modulada por componentes de la superficie bacteriana. Pero las bacterias presentan diferencias estructurales que son importantes conocer y comprender como pueden afectar la interacción con las células fagocíticas.

La estructura de la pared celular es diferente entre las bacterias gram positivas y gram negativas. En general, una bacteria gram positiva tiene una membrana plasmática rodeada de una pared celular compuesta principalmente de peptidoglicanos con ácidos teicoicos, ácido lipoteicoico, lipoproteínas y polisacáridos complejos que son esenciales para la viabilidad y para promover la unión a otras bacterias y a receptores específicos en la superficie de células de mamíferos (ver **figura 34**). En efecto, hay evidencia creciente de que las lipoproteínas juegan un papel importante en la activación del receptor TLR2 en los estafilococos (27). Además la toxina de Pantón-Valentine ha sido identificado como un potente ligando de TLR2. Por el contrario, es controvertido que el peptidoglicano y el ácido lipoteicoico sean potentes ligandos (20).

También se ha identificado una familia de proteínas de adhesión, unidas con enlaces covalentes a los peptidoglicanos en los estafilococos que se ha denominado MSCRAMM (componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de la matriz adhesiva) que pueden actuar como "invasinas" capaces de favorecer la penetración de *Staphylococcus aureus* en células hospedadoras (20). Esta pared celular se puede teñir con el colorante cristal violeta o violeta de genciana y permite visualizar a las bacterias gram positivas y diferenciarlas de las bacterias gram negativas.

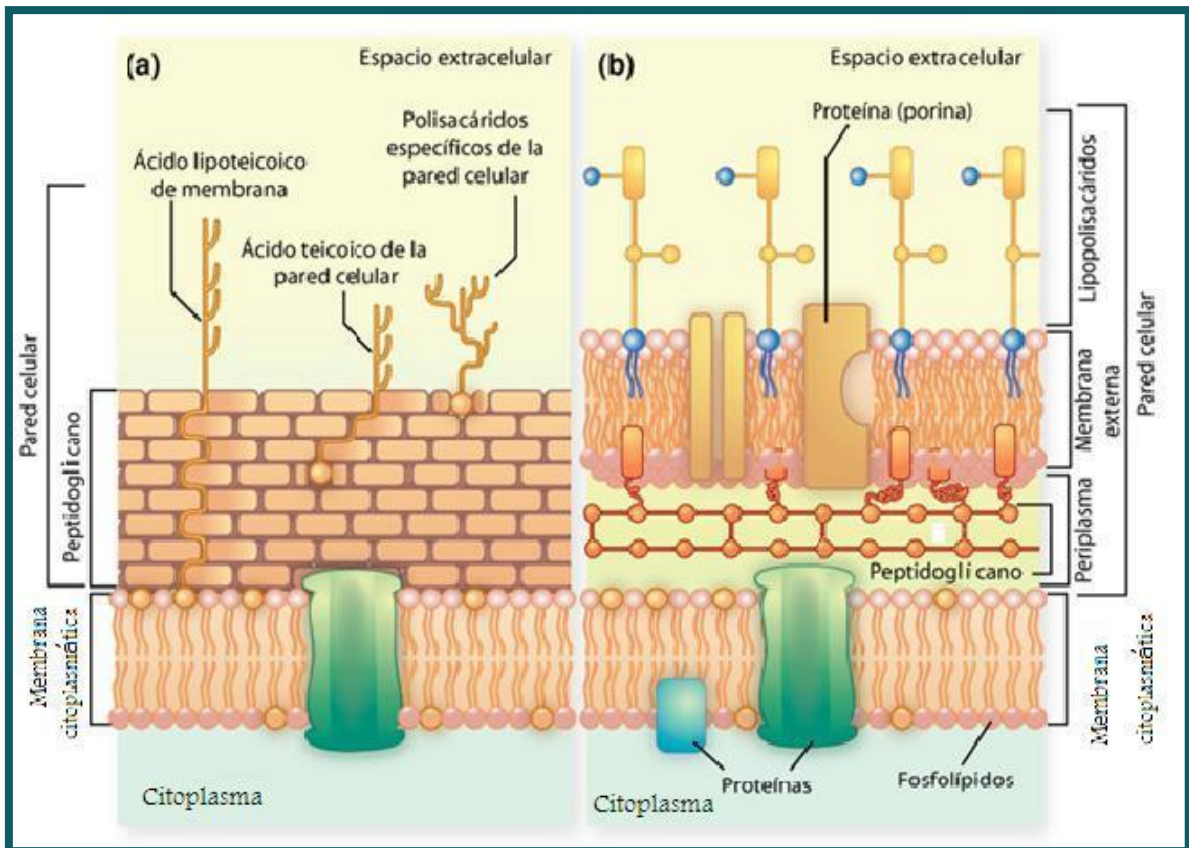


Figura 34: Figura representativa de las características morfológicas y estructurales de las bacterias gram positivas y gram negativas. (A) Esquema de las bacterias gram positivas. (B) Esquema de las bacterias gram negativas. Figura adaptada de la publicada el 17-01-2013 en el siguiente enlace: <http://www.vi.cl/foro/topic/1071-apuntes-de-biologia-y-quimica-revisado-y-corregido/page-63>.

Las bacterias gram negativas tienen una pared celular más compleja que las bacterias gram positivas. A diferencia de la bacteria gram positiva, la capa de peptidoglicano en la bacteria gram negativa es delgada y está rodeada por otra membrana que es una bicapa lipídica, la cual está formada en su zona externa por LPS y en su zona interna por fosfolípidos. Hay también un espacio periplásmico que contiene enzimas líticas y factores de virulencia. Los LPS son también conocidos como endotoxinas, que activan la respuesta inmune a través del receptor TLR4 y su correceptor LY96 (114), (24). Las bacterias gram negativas se caracterizan porque son ácido alcohol sensibles y aunque se tiñen con el colorante cristal violeta o violeta de genciana, se decoloran fácilmente con alcohol acetona; por lo que se añade otro colorante como safranina o fuscina básica para poder identificarlos en el microscopio.

En nuestros experimentos de fagocitosis se utilizaron una cepa de *Staphylococcus aureus* que es una bacteria gram positiva y dos cepas de *Escherichia coli* que son bacterias gram negativas. Los resultados mostraron que las cepas de bacterias gram negativas eran más fagocitadas en ausencia de FAST con un valor estadísticamente significativo. Por su parte, la cepa bacteriana gram positiva presentaba porcentajes de fagocitosis superiores a las bacterias gram negativas tanto en macrófagos WT como KO pero sin diferencias

estadísticamente significativas con respecto a la ausencia de FAST. Creemos que estas diferencias pueden ser explicadas por las características estructurales y por los diferentes mecanismos de defensa de las bacterias utilizadas.

Las diferencias estructurales entre gram positivos y gram negativos antes mencionadas, pueden explicar el porqué en ausencia de opsoninas, *Staphylococcus aureus* es más fácilmente fagocitado por los macrófagos peritoneales de ratones comparado con *Escherichia coli*. El peptidoglicano que es un componente muy abundante en las paredes celulares de las bacterias gram positivas y juega un papel muy importante en la fagocitosis de estas bacterias a través de TLR2 (115). Por su parte, el LPS es un componente principal de las paredes celulares de las bacterias gram negativas e inducen a los macrófagos para fagocitar las bacterias gram negativas a través de los TLR4 (115).

Otra posible explicación se basa en la presencia de mecanismos de defensa frente a la fagocitosis. De hecho, muchas cepas de *Escherichia coli* producen una capsula polisacárida extracelular que permite a la bacteria evitar la fagocitosis y la inactivación por los factores del complemento (116). *S. aureus* también ha desarrollado varias propiedades antifagocíticas. La proteína A que es un componente de la pared celular de *S. aureus*, puede contribuir a la formación de biopelículas para prevenir la fagocitosis. El ácido lipoteicoico y el factor de aglutinación A que es una proteína de la superficie de unión a fibrinógeno de *S. aureus*, pueden interferir e inhibir la fagocitosis de los leucocitos contra *S. aureus* (115). Pensamos que ambos factores explican las diferencias de porcentajes de fagocitosis entre bacterias gram negativas y gram positivas como se observa en la **figura 24**.

Otro aspecto a considerar en nuestros resultados es que la fagocitosis de las bacterias gram positivas no presentan diferencias estadísticamente significativas entre macrófagos WT y KO. Una posible explicación se basa en que los receptores con afinidad por las bacterias gram positivas se encuentran saturadas y aunque los macrófagos KO son más proclives a la fagocitosis, éste no aumenta porque no hay más receptores suficientes para unirse a las bacterias. De hecho la concentración de los receptores TLR2 con alta afinidad por las bacterias gram positivas presentan similares perfiles de expresión como se observa en la **figura 27-A**.

Los macrófagos tienen una gran variedad de receptores que son capaces de interactuar con los diferentes patógenos y restos celulares. Un ejemplo característico lo constituyen los receptores TLR4 que presentan mayor afinidad por las bacterias gram negativas (24) y son ayudadas por la proteína de membrana CD14 que facilita el reconocimiento del LPS por el TLR4. CD14 interacciona con el TLR, transfiriendo el LPS que está unido previamente con LBP al LY96 (ver **figura 4**). Los dominios N-terminal y central de TLR4 proporcionan un área hidrofílica para su unión en el co-receptor LY-96 formando un estable heterodimero 1:1. LY-96 es más pequeño que TLR4 y posee una estructura plegable cuyo interior es hidrofóbico y tiene la forma ideal para la unión de ligandos hidrofóbicos planos como el LPS (104). Por tanto, los macrófagos poseen diferentes

herramientas para favorecer la fagocitosis bacteriana y además presentan diversos mecanismos bactericidas para su destrucción y eliminación.

FAST Y ACTIVIDAD BACTERICIDA

La fagocitosis de las bacterias es un mecanismo bastante eficaz de defensa del sistema inmune que se acompaña de diversos mecanismos bactericidas debido a que los microorganismos presentan variaciones estructurales y diferentes mecanismos patogénicos.

Los mecanismos bactericidas (ver **figura 2**) se pueden clasificar en:

1. Químicos: por ejemplo: la acidificación de los fagosomas ó la producción de ROS.
2. Enzimáticos: por ejemplo: endopeptidasas, helicasas, entre otras.
3. Secuestro de nutrientes: por ejemplo: lactoferrina que secuestra el hierro disponible.

En nuestros experimentos se analizó si la ausencia de FAST afectaba la actividad bactericida de los macrófagos. Para ello se realizó el ensayo de protección con gentamicina y se midió la producción de ROS en macrófagos WT y KO cuando se expusieron a *Escherichia coli* DH5- α .

El ensayo de protección con gentamicina mostró que a las 6 y 24 horas post-infección la actividad bactericida de los macrófagos KO es similar a los macrófagos WT como se muestra en la **figura 26-A**. Esto nos plantea que todos los diversos mecanismos que poseen los macrófagos para matar a las bacterias funcionan correctamente y FAST no está involucrada en los mismos.

Las ROS juegan un papel fisiológico importante y al mismo tiempo son capaces de ejercer efectos tóxicos. Todas las ROS son producidas como consecuencia del metabolismo y participan en la producción de energía, la síntesis de compuestos biológicos, la transducción de señales y la fagocitosis, Las ROS son componentes esenciales de la respuesta inmune innata frente a bacterias intracelulares. La producción de ROS se realiza principalmente a través de la enzima NADH oxidasa en la pared del fagosoma y en las mitocondrias a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS) cuando los electrones que escapan prematuramente de los complejos I y III, reaccionan con moléculas de oxígeno para generar superóxido (117).

La producción de ROS se midió usando la citometría de flujo y mostró que tanto los niveles basales como los niveles posterior a la exposición con una cepa gram negativa eran similares en los macrófagos WT y KO (**figura 26-B**). Así que FAST no participa de la producción de radicales de oxígeno y por tanto la capacidad intracelular de matar las bacterias gram negativas no depende de la presencia de FAST.

La actividad bactericida puede verse afectada por los mecanismos de defensa de las bacterias. Un ejemplo característico lo constituye el *Staphylococcus aureus*, que puede

escapar rápidamente de los fagosomas y proliferar dentro del citoplasma del macrófago al inducir la expresión de CXCR1 (115).

Además de valorar la actividad bactericida de los macrófagos, otro aspecto destacado para analizar de la fagocitosis es la remodelación del citoesqueleto que se produce para la formación de los fagosomas.

CONTENIDO DE F-ACTINA EN LA FAGOCITOSIS

La fagocitosis requiere el remodelamiento del citoesqueleto de actina para producir fagosomas ricos en F-actina (50). El citoplasma de los macrófagos se encuentra más desarrollado en comparación con otras células del organismo, ya que su actividad fagocítica así lo requiere. Por tanto era necesario analizar el contenido de F-actina en los macrófagos KO, ya que su capacidad fagocítica es mayor comparado con los macrófagos WT. Además un hallazgo llamativo observado cuando se cultivaron los macrófagos peritoneales KO o cuando se trataron los macrófagos humanos con siRNA frente a FAST fue el cambio morfológico de estas células respecto a células control. Se observaron células de apariencia más grande debido a un incremento de las extensiones citoplásmicas cuando se adhirieron al plástico de las placas de cultivo.

En nuestros experimentos se examinó el contenido de actina polimerizada mediante tinción con faloidina-TRITC y posterior análisis por FACS. Nuestros resultados mostraron un contenido de F-actina significativamente incrementado tanto en THP-1 tratadas con siRNA contra FAST, como en macrófagos KO en comparación con sus respectivos controles (**figura 27-B**). Teniendo en cuenta la importancia de la polimerización de actina en el proceso de internalización de patógenos, hipotetizamos que el incremento en su contenido podría tener relación con el incremento de fagocitosis observado.

Los macrófagos KO tienen elevado contenido de F-actina cuando se fagocitan bacterias no opsonizadas comparado con macrófagos WT. Curiosamente, el silenciamiento de FAST mediante pequeños RNA de interferencia en las neuronas primarias y en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, promueve el crecimiento de neuritas (86). El crecimiento de neuritas es un paso crítico en la maduración neuronal, y es bien conocido que la actina del citoesqueleto participa en este proceso (118). Por tanto, una línea de investigación a seguir consiste en explorar las vías de señalización que subyacen a la elevación del contenido de F-actina en los macrófagos KO comparado con los macrófagos WT, el cual puede ser similar a lo que induce el crecimiento de las neuritas en las neuronas con silenciamiento de FAST.

Otra línea de investigación a seguir consiste en esclarecer los posibles mecanismos biológicos que expliquen como la ausencia de FAST aumenta la fagocitosis. Uno de ellos se basa en el *splicing* alternativo.

SPLICING ALTERNATIVO, FAST Y FAGOCITOSIS

FAST se encuentra en el citoplasma y en el núcleo. En el núcleo, se ha descrito que FAST actúa como un regulador del *splicing* alternativo (79), (78). En ensayos de *splicing in vitro* de FGFR2 y Fas, se demostró la habilidad de FAST para incluir el exón IIIb de FGFR2 y el exón 6 de Fas (79), (78). Por tanto, un posible mecanismo que explicaría el efecto de FAST en la fagocitosis de los macrófagos pudiera ser la producción de variantes proteicas con un papel en la fagocitosis a través del *splicing* alternativo.

Hay una limitada literatura científica de cómo el *splicing* alternativo de RNA afecta a las proteínas involucradas directamente en la fagocitosis. La lactoadherina también conocido como MFGE8 promueve la fagocitosis de células apoptóticas al servir de molécula puente entre las células apoptóticas y los fagocitos. Se describió recientemente dos pacientes femeninas con lupus eritematoso sistémico que presentan una mutación intrónica heterocigota, la cual causa que el intrón 6 se incluya en la transcripción. Éste exón crítico contiene un codón de terminación prematura que genera una proteína MFGE8 C-terminal truncada. La proteína mutante MFGE8 glicosilada, sialilada y unida a una fosfatidilserina es capaz de aumentar la fagocitosis de las células apoptóticas (119).

CD33 (también conocido como SIGLEC-3) es un receptor transmembrana expresado en células de la línea mieloide que inhibe la fagocitosis. Se ha reportado recientemente sobre un polimorfismo de un nucleótido (SNP) que altera la formación del mRNA de CD33 y conduce a la síntesis de un receptor inactivo porque el mRNA de CD33 carece del exón 2. Esto provoca que se active la fagocitosis (120).

Se realizaron algunos experimentos no incluidos en esta Tesis Doctoral donde hemos explorado el perfil de expresión de exones en macrófagos peritoneales de ratones FAST KO y no hemos identificado alteraciones en el *splicing* alternativo del mRNA de proteínas que participan tanto directa como indirectamente en el proceso de fagocitosis. En la fagocitosis se consume energía que proviene principalmente de las mitocondrias, así que otro posible mecanismo biológico puede estar relacionado con la respiración mitocondrial.

RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL, FAST Y FAGOCITOSIS

Los macrófagos demandan energía, no solo para realizar los procesos de fagocitosis y de síntesis, sino también para mantener el equilibrio estable con el medio extracelular. Las mitocondrias son las organelas responsables de este aporte energético y poseen una estructura característica para cumplir sus funciones. Las mitocondrias (ver **figura 35**) están recubiertas por una doble membrana: la **membrana interna** circunscribe a la **matriz mitocondrial** y la **membrana externa** se encarga de seleccionar las moléculas solubles que penetran a la matriz (iones y moléculas de bajo peso molecular). Entre ambas existe un espacio intermembrana y se ponen en contacto en puntos muy dispersos. La membrana interna muestra en su periferia abundantes pliegues o **crestas mitocondriales** que tienen

una conexión estrecha con el espacio intermembrana y presentan proteínas transportadoras específicas. La membrana interna de las crestas está formada por un 80% de proteínas y un 20% de lípidos. La membrana interna tiene permeabilidad selectiva así que sólo permite el paso de ciertas moléculas como el piruvato y ATP. La matriz mitocondrial contiene enzimas, coenzimas, agua, fosfatos y otras moléculas que intervienen en la respiración, también es asiento de otras funciones metabólicas como la degradación de ácidos grasos, transaminación y desaminación de aminoácidos y desintoxicación (47) ,(97), (121) (122).



Figura 35: Microfotografía electrónica de una mitocondria en un microscopio de transmisión. Aumento 60.000x. Figura tomada el 15-01-2016 en el siguiente enlace: <http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/MONOWEB/bibliografia.htm>.

El tamaño de las mitocondrias también varía desde 0,1 hasta varios micrómetros. Pueden ser redondas o alargadas, e incluso presentar bifurcaciones (47). Las mitocondrias se fusionan entre sí y se dividen lo que permite el intercambio de material genético y posiblemente la supervivencia celular. El **genoma mitocondrial humano** está constituido por moléculas circulares de DNA de 16 kb que codifican 13 proteínas implicadas en el **transporte de electrones** y en la **fosforilación oxidativa** como se observa en la **figura 36**. Los genes se transcriben y traducen dentro de las mitocondrias, que contienen sus propios ribosomas y RNA (46). La transcripción del genoma mitocondrial genera dos mRNA policistrónicos. La cadena pesada expresa dos rRNA, 14 tRNA y 12 mRNA, mientras que la cadena ligera sólo expresa el mRNA de la proteína ND6 y 8 tRNA (97). (Ver **figura 37**).

se produce por cada ciclo una molécula de **GTP**, tres de **NADH** y una de **FADH₂** (ver **Figura 39**) (46). Así que por cada molécula de glucosa se obtiene neto: 2 ATP, 10 NADH, 2 GTP, 6 CO₂ y 2 FADH₂.

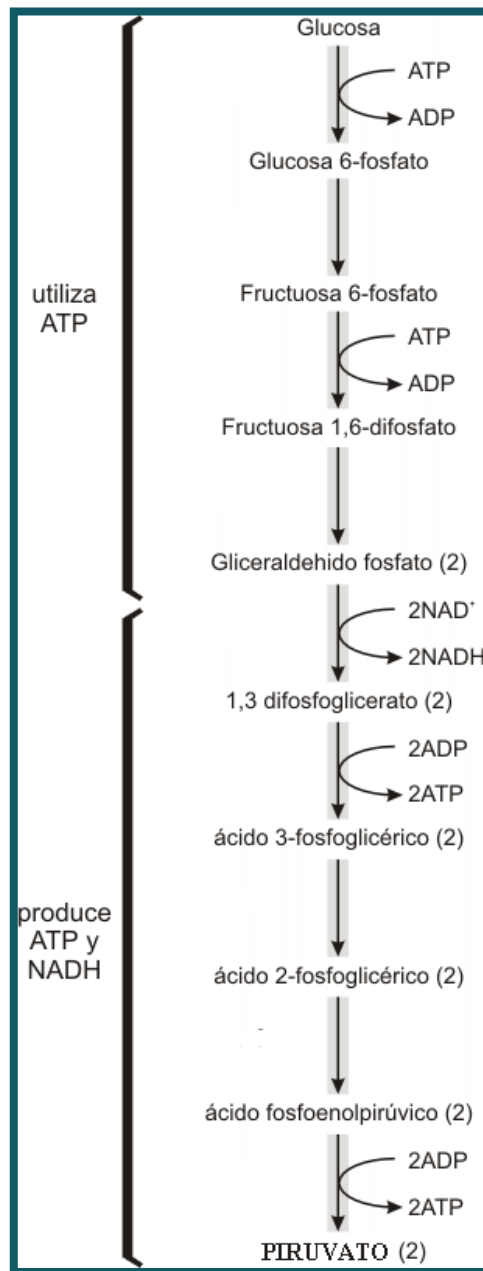


Figura 38: Glucólisis. Representación de la glucólisis que se produce en el citoplasma, donde se consumen dos moléculas de ATP, se produce cuatro moléculas y dos de NADH y se obtiene 2 moléculas de piruvato. Figura adaptada de Zabala, 2015 (121).

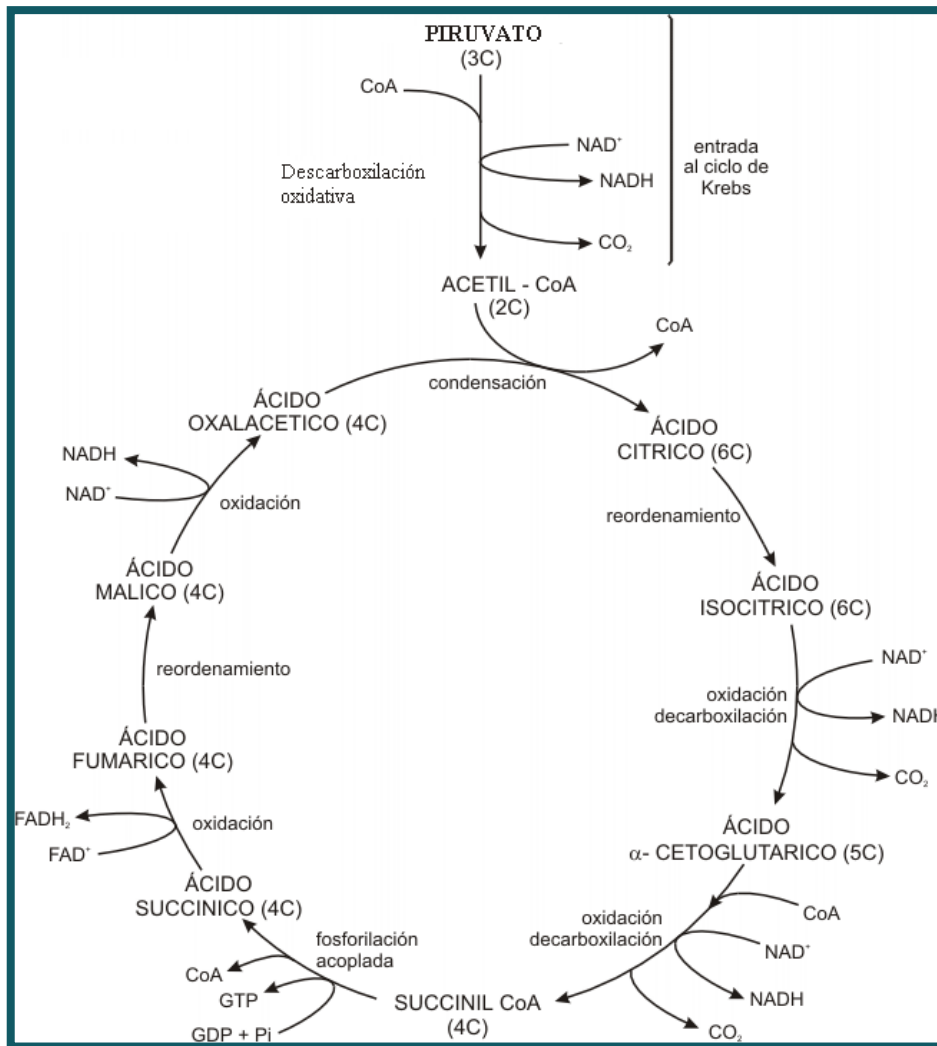


Figura 39: Ciclo del ácido cítrico (ciclo de Krebs). Representación del ciclo del ácido cítrico. Por cada molécula de acetilCoA se obtiene una molécula de GTP, tres de NADH y una de FADH₂. Figura adaptada de Zabala, 2015 (121).

Los electrones presentes en NADH entran en la **cadena transportadora de electrones** en el **complejo I** mitocondrial, constituido por 43 cadenas polipeptídicas, se suceden diferentes pasos de oxidación y reducción con liberación de energía, luego los electrones pasan por el **complejo III**, constituido por 10 polipéptidos aproximadamente, donde también se libera energía y por último en el **complejo IV** los electrones son transferidos al O₂. Por su parte, los electrones presentes en FADH₂ entran en la cadena transportadora de electrones en el **complejo II** formado por cuatro polipéptidos, pasan por el complejo III y IV liberando también energía y finalmente también son transferidos al O₂. El transporte de electrones a través de los complejos I, III y IV está acoplado al **transporte de protones** (H⁺) al espacio intermembrana generando un gradiente de protones. Los complejos I y III transfieren cuatro protones cada uno por cada par de electrones, mientras que el complejo IV transfiere dos protones al espacio intermembrana y otros dos protones se combinan con el O₂ para formar agua en la matriz (46) (ver **figura 40**).

Los protones en el espacio intermembrana generan un **gradiente electroquímico** formado por un potencial eléctrico de 0,14 V a través de la membrana y un potencial químico por la

diferencia de pH entre el espacio intermembrana que es de 7 y la matriz mitocondrial que es de 8. La energía del gradiente electroquímico se convierte en ATP mediante la acción del **complejo V** ó ATP sintetasa, formada por dos subunidades; F_0 que proporciona el canal de paso de los protones y F_1 que cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP e iones fosfato (ver **figura 40**). De esta manera, la oxidación de una molécula de NADH da lugar a la síntesis de tres moléculas de ATP y una de $FADH_2$ genera dos moléculas de ATP (46). Así que por cada molécula de glucosa se obtiene en total: 38 moléculas de ATP. Las mitocondrias generan el 95% del ATP celular.

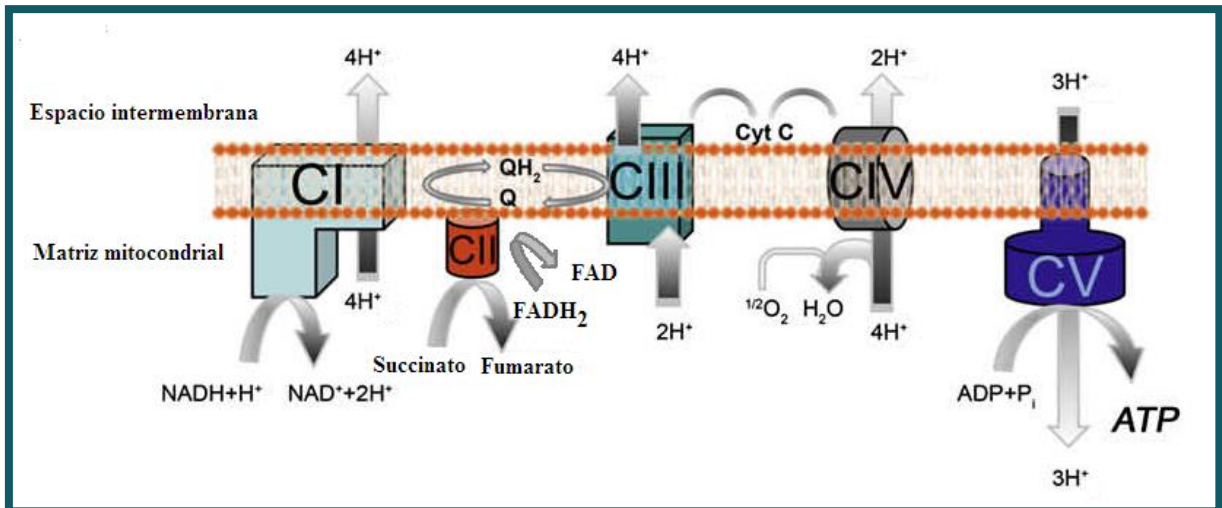


Figura 40: Cadena transportadora de electrones y transporte de protones a través de los complejos mitocondriales. Figura adaptada de Acín-Pérez, 2008.

Las mitocondrias son organelas complejas y aunque las primeras descripciones han sido desde la década de 1880, aún hay aspectos por explorar y comprender en especial la interacción con el núcleo y con las diversas funciones celulares como la fagocitosis. Las funciones mitocondriales están sincronizadas con el núcleo y los diferentes estímulos extracelulares. De hecho, en el 2011 se demostró que la fagocitosis de las células apoptóticas aumenta la actividad mitocondrial (123). Además se ha observado que cuando se activan los fagocitos durante una infección se promueve su actividad glicolítica facilitando así su función en los sitios de inflamación (124-125). El LPS de las bacterias gram negativas induce cambios en la respiración mitocondrial y en la fosforilación oxidativa para aumentar la glucólisis en los macrófagos (126). Este inductor conduce a la acumulación del intermediario succinato del ciclo del ácido cítrico que estabiliza a **HIF1A** y que conduce a la expresión de **IL1B** (124).

Sin embargo, la regulación de la respiración mitocondrial es más complicada. El sistema de fosforilación oxidativa incluye una cadena transportadora de electrones compuesta por cinco complejos respiratorios. Anteriormente se creía que los complejos respiratorios se movían libremente en la membrana interna de la mitocondria, pero este punto de vista ha sido cuestionado, proponiendo que los complejos forman supercomplejos llamados respirasomas que contienen los complejos CI, CIII y CIV, ó CI y CIII ó CIII y CIV; estos supercomplejos están equilibrados en la membrana mitocondrial (127). El conjunto de los

supercomplejos es dinámico y regula el flujo de electrones de los sustratos disponibles (128). Además, la reorganización de los complejos puede afectar a otras funciones de la cadena transportadora de la fosforilación oxidativa y pueden regular la generación de ROS mitocondrial, el cual contribuye en menor medida en la degradación del material ingerido (117).

Recientemente se ha asociado a la familia de proteínas FASTKD con las mitocondrias. FAST es el miembro fundador de esta familia de proteínas mitocondriales (FASTKD 1-5) que comparten un dominio amino terminal que es un péptido de señalización mitocondrial, dos dominios de proteínas parecidas a FAST de función desconocida y un dominio RAP del cual se ha sido propuesto que participa en la unión al RNA en el extremo carboxilo terminal (74), (75). Todos los transcritos de los miembros de la familia FAST son ubicuos, pero algunos están expresados más abundantemente en tejidos ricos en mitocondrias como el músculo esquelético, corazón y tejido adiposo graso (75).

En nuestros resultados observamos que FAST muestra dos formas en el análisis de transferencia de Western blot que se realizó con macrófagos humanos transfectados con siRNA#1 (ver **figura 32**). Una banda de 60 KDa que se corresponde a la forma extramitocondrial y otra banda de 50 KDa que se corresponde a la forma intramitocondrial de FAST. Estos resultados también coinciden con los obtenidos por Jourdain y colaboradores al estudiar la localización de FAST en las células 143B (línea celular proveniente de un osteosaroma de mujer de 13 años) y fibroblastos embrionarios de ratón (ver **Figura 41**). Identifican un citoFAST que sería la forma extramitocondrial y un mitoFAST que sería la forma intramitocondrial que describimos.

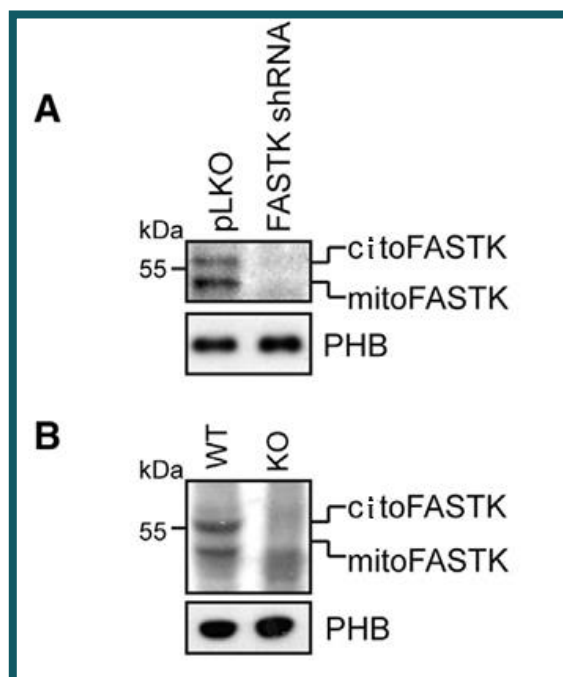


Figura 41: FAST es una proteína mitocondrial. (A) Analisis de Inmunoblot de las células 143B que expresan shRNA estable dirigido contra FAST. Las membranas fueron sondadas con anti-FAST y resonadas con anti-PHB para verificar igual carga de muestra. (B) Analisis de Inmunoblot de fibroblastos

embrionarios de ratón WT y KO. Las membranas fueron sondadas con la misma técnica de A. Figura adaptada de Jourdain, 2015.

Las dos isoformas de FAST se producen a través de mecanismos postranscripcionales. El mRNA de FAST tiene dos codones de iniciación ATG en la posición 1 y 103 que codifican para la metionina 1 y metionina 35 respectivamente. La citoFAST es la isoforma larga que contiene todos los aminoácidos codificados empezando por la metionina 1, y se encuentra en el núcleo y en los gránulos de estrés citoplasmáticos antes mencionados. La mitoFAST es la isoforma corta que empieza por la metionina 35 y se encuentra exclusivamente en focos específicos dentro de las mitocondrias (ver **figura 42**) llamados gránulos de RNA (129), (76).

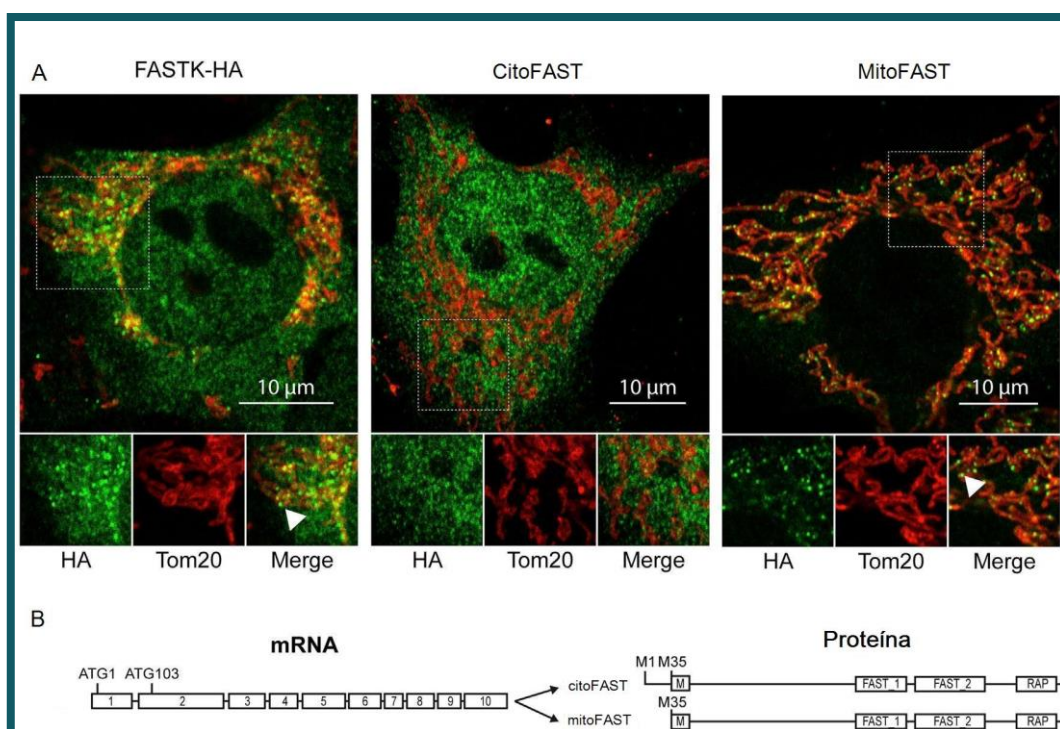


Figura 42: FAST es una proteína mitocondrial. (A) Microscopía con focal de células 143B teñidas. Las puntas de flecha señalan los gránulos de RNA mitocondrial. (B) El mRNA del gen FAST tiene 10 exones y dos codones de iniciación ATG localizados en la posición 1 que codifica la metionina 1 y en la posición 103 que codifica la metionina 35. La mitoFAST se presenta sólo cuando la traducción comienza en el codón ATG 103. Los dominios FAST_1, FAST_2 y RAP son los dominios conservados de FAST Figura adaptada de Jourdain, 2015.

Hay otros hallazgos científicos de los miembros de la familia FAST que apuntan como posibles mecanismos biológicos la respiración mitocondrial y el metabolismo del RNA mitocondrial que profundizaremos a continuación.

FAST, miembros de la familia FASTKD, respiración mitocondrial y metabolismo del RNA mitocondrial

No sólo FAST es una proteína mitocondrial, las proteínas FASTKD1-5 también poseen secuencias de localización mitocondrial que fueron confirmadas por inmunofluorescencia como se observa en la **figura 17** (75). La restricción de los miembros de la familia

FASTKD a las clases de animales relativamente recientes, sugiere que estas proteínas pueden modular la regulación fina de producción de energía en la mitocondria (75).

Ghezzi y colaboradores en el 2008 han identificado en dos hermanos con encefalomiopatía mitocondrial infantil una mutación homocigota sin sentido de FASTKD2 que se asocia a una deficiencia del citocromo C oxidasa (complejo IV de la cadena transportadora de electrones) (89). La enzima citocromo oxidasa C recibe electrones de las moléculas reducidas y los transfiere luego al oxígeno. En este proceso, se transloca cuatro protones a través de la membrana, para establecer el potencial de membrana mitocondrial. La función de FASTKD2 y el mecanismo biológico subyacente no pudo ser aclarado en ese momento pero se sugirió que participaba en la regulación de la producción de energía en las mitocondrias (89). Posteriormente, Popow y colaboradores hallaron que en células deficientes de FASTKD2 se producía disminución de la respiración mitocondrial por una reducción de la actividad de todos los complejos mitocondriales (130).

Posteriormente en el 2010, se ha reportado que el silenciamiento de FASTKD3 en la línea celular U2OS derivada de un osteosarcoma humano provoca una disminución tanto de la tasa de consumo de oxígeno basal como de la tasa de respiración máxima. Se utilizó un analizador de flujo extracelular para comparar las tasas de consumo de oxígeno en células U2OS tratadas con siRNAs del control (control siRNA#1, D0) ó siRNAs contra FASTKD3 (FASTKD3 siRNA#1). Las U2OS tratadas con siRNAs contra FASTKD3 presentan menores tasas de consumo de oxígeno comparadas con el control. La adición de oligomicina que inhibe a la enzima ATP sintasa permite cuantificar la respiración acoplada a ATP, que se redujo en las células U2OS tratadas con siRNAs contra FASTKD3. La adición de un desacoplador mitocondrial (FCCP) provocó un aumento de la tasa de consumo de oxígeno aunque muy inferior comparado con el control como se observa en la **figura 43-A**. Estos datos sugieren un deterioro de la capacidad respiratoria de reserva en las células U2OS tratadas con siRNAs del FASTKD3 frente a las crecientes demandas metabólicas. La adición de rotenona (inhibidor del complejo I) provocó una reducción adicional de las tasas de consumo de oxígeno equivalente a las fugas de protones. Estos resultados revelan que FASTKD3 se requiere para la normal respiración mitocondrial, posiblemente a través de su interacción con proteínas implicadas en la respiración celular; pero no se requiere para el acoplamiento de los complejos de la cadena respiratoria como se demostró con la técnica de inmunotransferencia que se observa en la **figura 43-B**. La inmunotransferencia se realizó con una mezcla de anticuerpos monoclonales dirigidos contra una subunidad de cada uno de los complejos de la cadena respiratoria que son lábiles cuando su correspondiente complejo no está ensamblado y por lo tanto, son indicativos de la cantidad de complejo ensamblado. VDAC1 es una proteína mitocondrial utilizado como control de carga. Estos resultados indican que la disminución del consumo de O₂ inducida por el siRNA de FASTKD3 no se debe a una alteración en el ensamblaje de los supercomplejos mitocondriales (75). Por tanto, estos resultados demuestran que FASTKD3 es necesario para la adecuada respiración mitocondrial y para el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial (75).

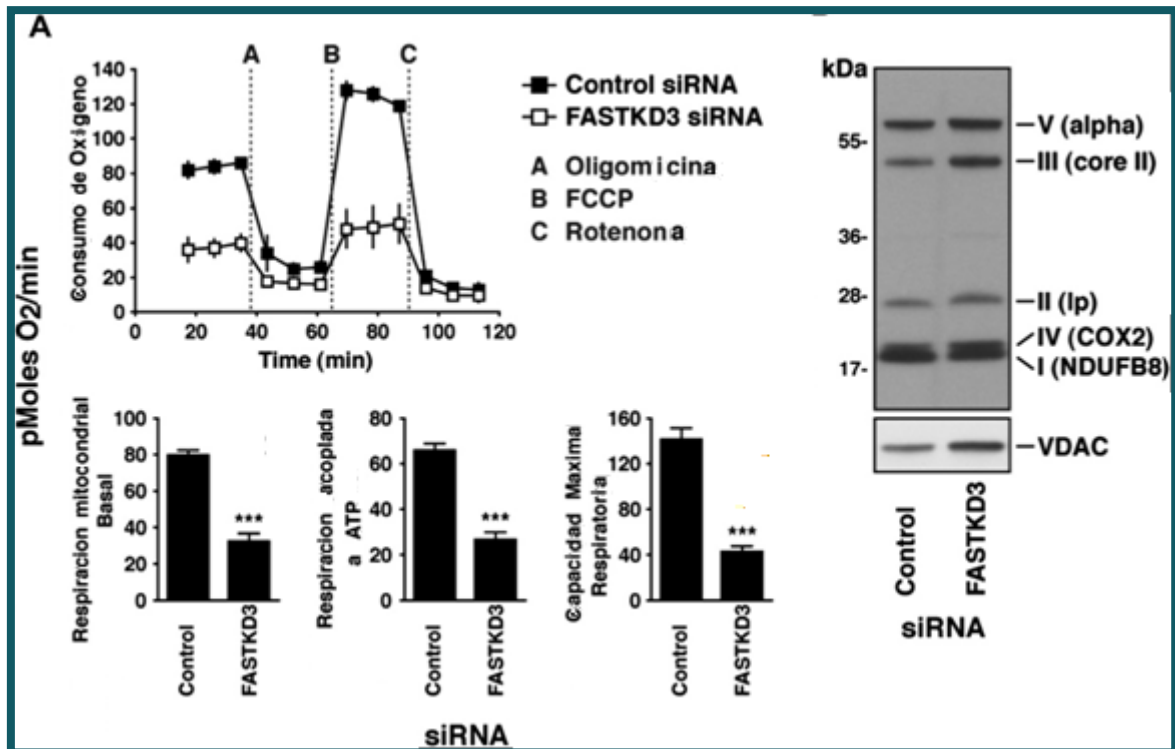


Figura 43: Funciones respiratorias de células *knockdown* de FASTKD3. (A) El consumo de oxígeno fue medido en células U2OS tratadas con siRNAs del control (control siRNA#1, D0) ó siRNAs del FASTKD3 (FASTKD3 siRNA#1). Las líneas verticales indican el tiempo de adición de los reactivos mitocondriales. Se representan diferentes parámetros respiratorios. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparado con el control. (B) El análisis de Western blotting de las subunidades representativas de los complejos canales respiratorios mitocondriales en extractos de proteínas mitocondriales de las células U2OS tratadas con siRNAs del control (control siRNA#1, D0) ó siRNAs del FASTKD3 (FASTKD3 siRNA#1): complejo I (NDUFB8, 20 kDa), complejo II (subunidad Ip, 30 kDa), complejo III (proteína del core II, 47 kDa), complejo IV (COX2, 24 kDa) y complejo V (la subunidad α de ATP sintasa, 53 kDa). VDAC es la proteína mitocondrial de control. Figura adaptada de Simarro, 2010.

Recientemente, Park y colaboradores reportaron que la deficiencia en la proteína desacopladora Ucp2 en ratones transgénicos mostraba profundos cambios y defectos *in vivo* en la eliminación de células en el timo y los testículos por parte de los macrófagos. Ellos también demuestran que la adición de diferentes desacopladores mitocondriales a la línea celular de fibroblastos LR73 incrementa su habilidad para fagocitar células apoptóticas (131). También se demostró que la deficiencia en la proteína desacopladora Ucp2 en macrófagos presentaba aumento de la capacidad para eliminar *Toxoplasma gondii* y *Salmonella typhimurium in vitro* debido a un incremento en la producción de ROS y NO así como incremento de citoquinas proinflamatorias (132).

FAST, así como FASTKD2 y FASTKD3, pueden ser necesarios para mantener el potencial de membrana mitocondrial, y esto pudiera incrementar la capacidad fagocítica de los macrófagos KO.

En colaboración con el prestigioso laboratorio de enfermedades mitocondriales del Hospital Universitario 12 de Octubre liderado por el Dr. Miguel Angel Martín Casanueva, hemos demostrado, en resultados preliminares, que los macrófagos de los ratones FAST

KO tienen una disminución en el potencial de membrana mitocondrial causada por una deficiencia específica del complejo I de la cadena respiratoria (del 40%) debido a una alteración en el metabolismo de algunos mRNA mitocondriales como se observa en la **tabla 7** y en la **figura 44**.

Tabla 7: Potencial de membrana mitocondrial en macrófagos WT y KO. *CI: N=2; CV WT=10,5%; CV KO=3,4%

	MACRÓFAGOS MURINOS	
	WT♀	KO♀
PROTS mg/mL	3,0	3,0
CS nmol/min mg	165,6	184,3
CI cU/UCS	30,0*	18,5*
CII cU/UCS	31,2	33,9
CIII cU/UCS	133,1	138,2
CIV cU/UCS	165,6	184,3

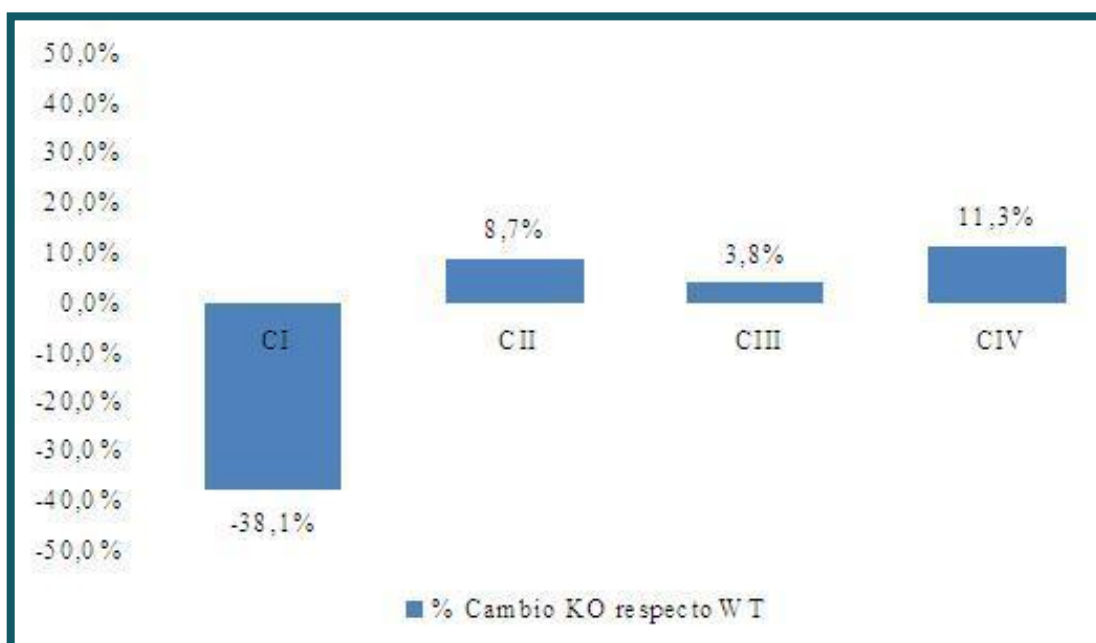


Figura 44: Deficiencia del complejo I de los macrófagos KO.

También durante la ejecución de esta Tesis Doctoral y en colaboración con Suiza se describió que FAST es necesario para la actividad del complejo I (76). Jourdain y colaboradores probaron la actividad enzimática de los complejos respiratorios de tejido esquelético y cardíaco en ratones WT y KO y observaron una disminución del 60% de la

NADH deshidrogenasa que esta presente en el complejo I, mientras que la actividad de los otros complejos no estaba alterado de manera significativa o incluso estaba ligeramente aumentado (ver **figura 45**), lo que también coincide con los resultados preliminares mostrados en la **figura 43**.

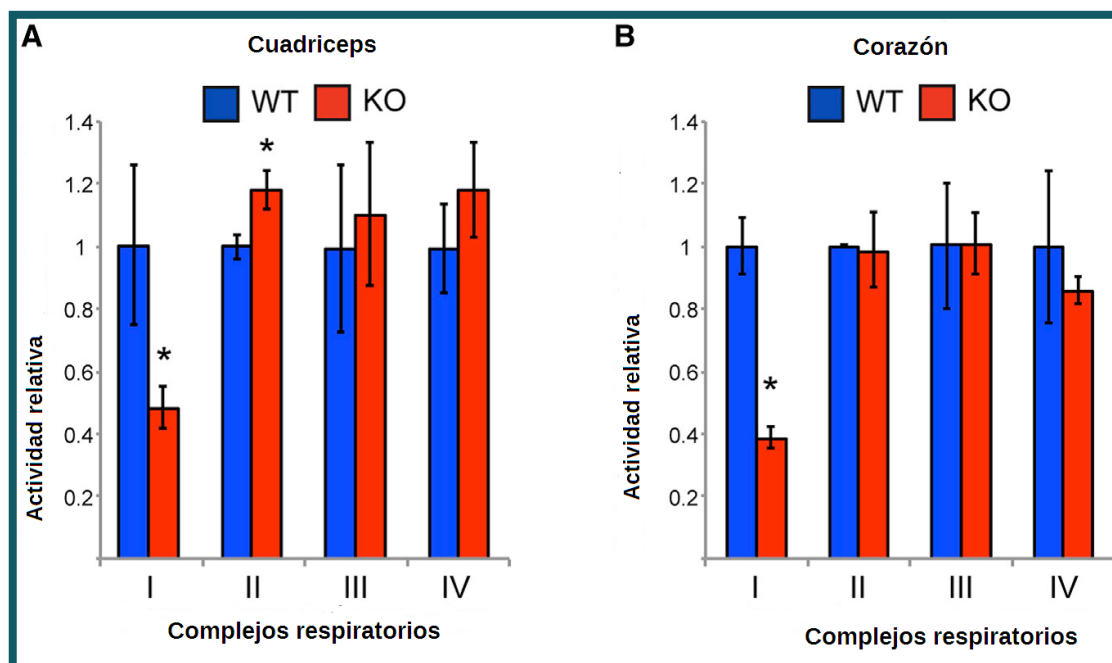


Figura 45: FAST es necesario para la actividad del Complejo I mitocondrial. A) Analisis de la actividad enzimática mitocondrial del músculo cuádriceps de ratones WT y KO. La actividad enzimática fue normalizada con la actividad de la citrato sintasa. Se representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes, * $p < 0.05$. (B) Analisis similar al presentado en (A) pero con corazón de ratones WT y KO. Figura adaptada de Jourdain, 2015.

Por tanto, la evidencia científica avala la participación de FAST en la regulación de la actividad del complejo mitocondrial I necesario para mantener el potencial de membrana mitocondrial y la producción de energía. La clave del mecanismo biológico subyacente a estos hallazgos esta en el metabolismo del RNA mitocondrial.

Los **gránulos de RNA mitocondriales** pueden estar asociados con proteínas cuya función principal es la regulación postranscripcional del RNA mitocondrial, tales como: RNasa P, RNasa Z y GRSF1 (133), (134). Se ha encontrado que FAST y su homologo FASTKD2 están presentes en estos gránulos aunque no son esenciales para su conformación.

Una de las funciones de FAST de reciente descripción en los gránulos mitocondriales, consiste en regular la expresión del mRNA de **ND6**, la única proteína codificada en la cadena liviana del transcrito de RNA mitocondrial. FAST se une a la cadena inmadura de mRNA en múltiples sitios y participa en la generación de la forma madura del mRNA de ND6, junto con el degradosoma mitocondrial o complejo helicasa polinucleótido fosforilasa mitocondrial que se encarga de degradar el RNA complementario, la polimerasa mitocondrial y el RNA metiltransferasa (ver **figura 46**). FAST modula la actividad del

degradosoma para generar mRNA maduros de ND6 evitando que degrade el transcrito de mRNA de ND6 (76).

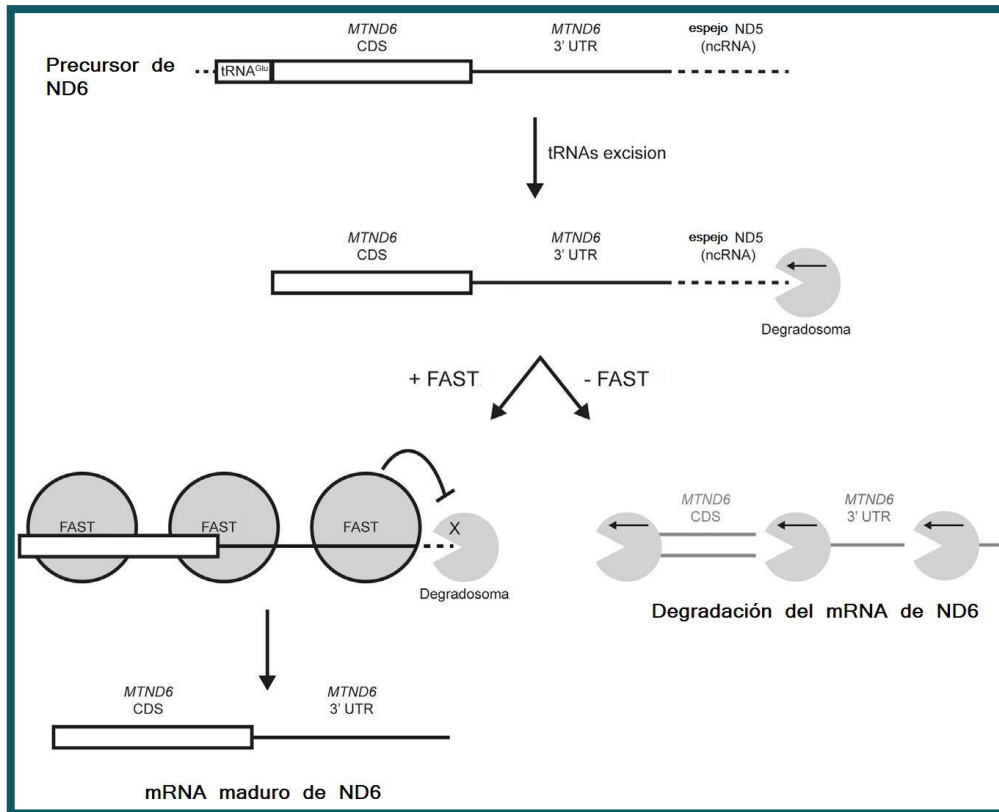


Figura 46: Participación de FAST en la generación de la forma madura del mRNA de ND6. FAST se une al precursor inmaduro de mRNA de ND6 en múltiples sitios inclusive el segmento UTR 3', y bloquea su degradación por parte del degradosoma mitocondrial. En ausencia de FAST, el degradosoma elimina completamente la cadena ligera de mRNA. CDS: *coding sequence*. UTR: *untranslated region*. ncNA: non-coding RNA. Figura adaptada de Jourdain, 2015.

La proteína ND6 forma parte del complejo I presente en las mitocondrias para la respiración celular. Se demostró que FAST es un factor límite en la expresión de esa proteína y no afecta otras proteínas ni complejos mitocondriales (ver **figura 47-A**). Además este efecto es demostrable en diferentes tejidos como cerebro, corazón, músculos e hígado, cuyas células son ricas en mitocondrias (ver **figura 47-B**). Particularmente el dominio RAP de FAST juega un papel central en la regulación del mRNA de ND6. Cuando hay ausencia de FAST, los niveles de mRNA de ND6 y la actividad del complejo I disminuyen significativamente (76).

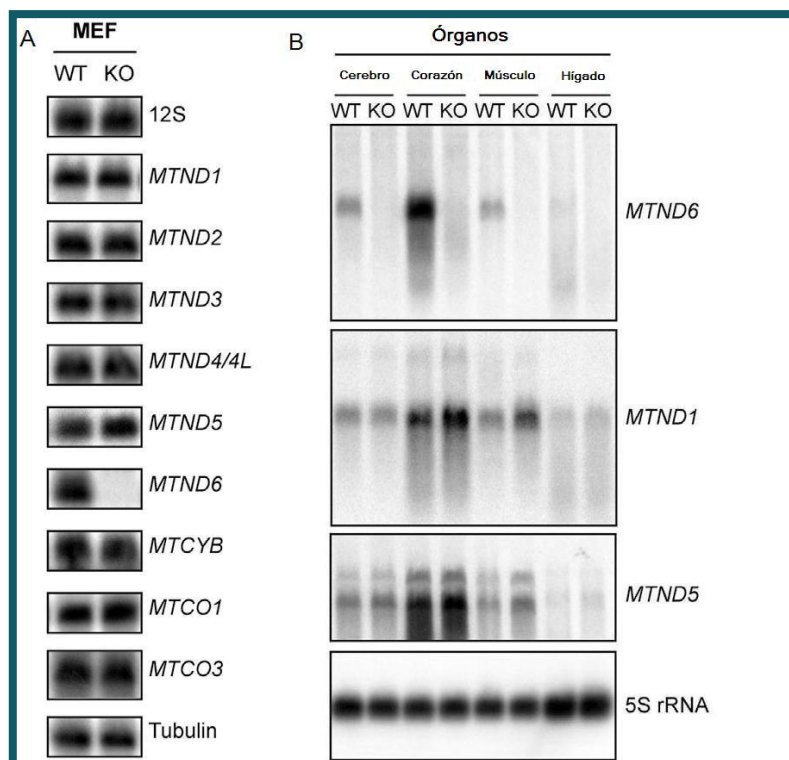


Figura 47: FAST regula la expresión de mRNA de ND6 en la mitocondria. (A) Northern blot representativo de RNA de fibroblastos de embriones de ratones (MEFs) WT y MEFs KO usando ribosondas contra todas las subunidades proteicas del complejo I. (B) Northern blot representativo de RNA total de cuatro órganos diferentes de ratones WT y KO. Figura adaptada de Jourdain, 2015.

También Popow y colaboradores encontraron que la ausencia de FASTKD2 conduce a una expresión alterada de mRNA de RNR2 y ND6 que codifica subunidades del complejo I mitocondrial, aunque en sus hallazgos fenotípicos se producía deterioro de la respiración mitocondrial con reducción de la actividad de todos los complejos mitocondriales (130)

Se ha descrito recientemente como FASTKD4 participa en el funcionamiento génico mitocondrial. El genoma mitocondrial es altamente compacto y está formado por una cadena pesada que expresa dos rRNAs, 14 tRNAs y 12 RNA mensajeros (mRNAs), mientras que la cadena ligera expresa el mRNA de la proteína ND6 y ocho tRNAs. Los mRNA mitocondriales (mt-mRNA) tienen diferentes vidas medias que se agrupan en dos categorías: los transcritos del complejo I (ND1–ND3 y ND5) y el transcrito CYTB del complejo III tienen vida media corta ($t_{1/2} = 68\text{--}94$ min), mientras que los transcritos del complejo IV (citocromo oxidasa 1 (COX1), COX2 y COX3); el transcrito ATP6/8 del complejo V y el transcrito ND4/4L del complejo I son de vida media larga ($t_{1/2} = 138\text{--}231$ min) (97).

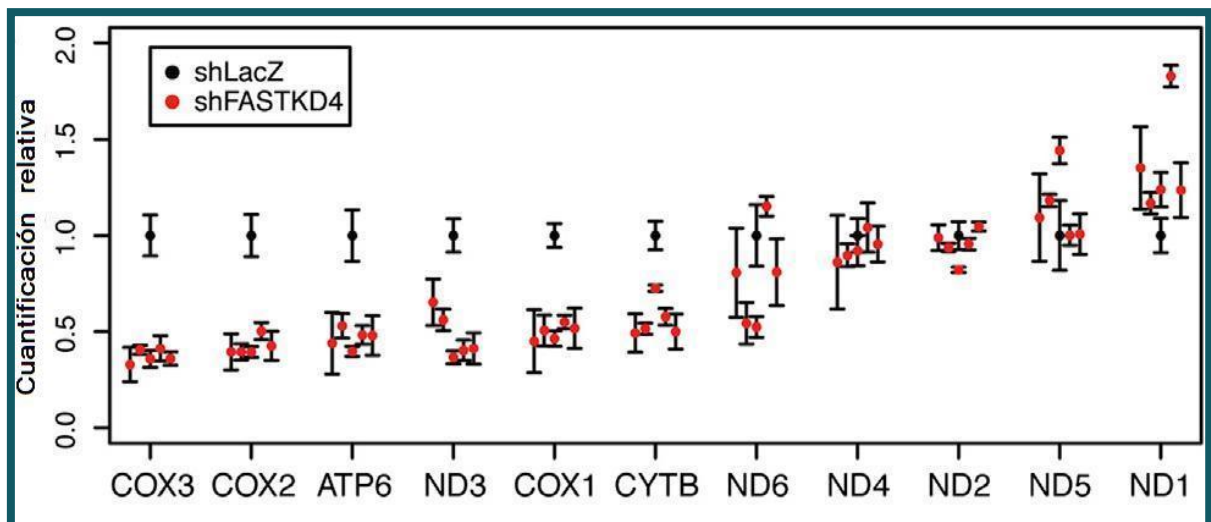


Figura 48: Contenido relativo de mt-mRNA en células HEK293T. Resultados de MitoString normalizados a shLacZ para cinco horquillas shFASTKD4 distintas en células HEK293T. La horquilla de control se muestra en negro, y las horquillas de FASTKD4 se muestran en rojo. Figura adaptada de Wolf 2014.

Se demostró que la ausencia de FASTKD4 afecta a algunos de los transcritos de mt-mRNA, los cuales son COX1–COX3, ATP6/8, CYTB y ND3, como se observa en la **figura 48**. Este efecto no se debe a una disminución del mtDNA, que por el contrario está aumentado como se observa en la **figura 49**. Así que, FASTKD4 estabiliza algunos transcritos de mtRNA y retrasa su degradación. Este efecto es palpable en COX2, ND3 y COX1 como se observa en la **figura 50**. Este efecto no es palpable en los transcritos COX3 y ATP6/8 que parecen depender de otros factores. Como consecuencia de la alteración de los niveles basales de estos transcritos, FASTKD4 provoca una marcada reducción del complejo IV en especial de la subunidad COX2 de la cadena respiratoria mitocondrial (97).

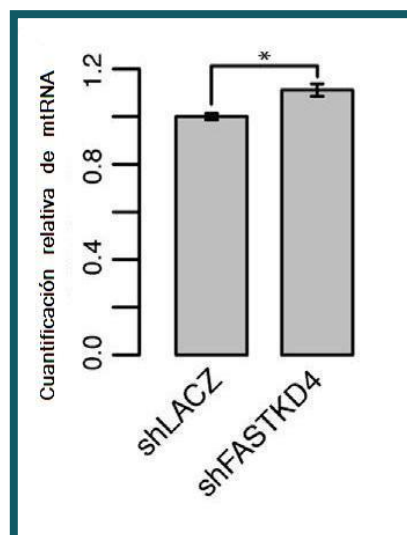


Figura 49: Cuantificación relativa de mtDNA en células knockdown de shFASTKD4. Cuantificación relativa de mtDNA en las células *knockdown* de shLacZ comparado con las células *knockdown* de shFASTKD4 medido a través de una PCR cuantitativa; * $p < 0.05$ (t-test de dos colas no apareadas). Figura adaptada de Wolf 2014.

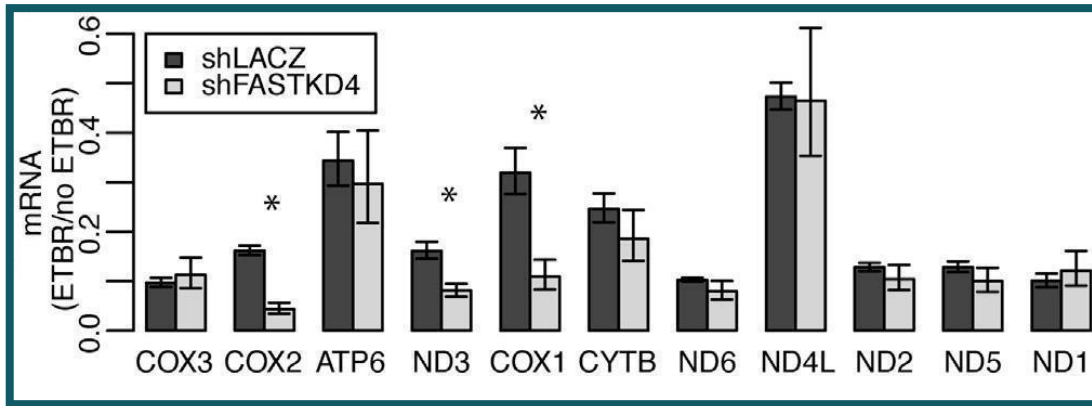


Figura 50: Fracción del RNA que permanece después de la inhibición de la transcripción con bromuro de etidio (ETBR) medido por una PCR cuantitativa en líneas celulares shLacZ y shFASTKD4. Figura adaptada de Wolf 2014.

Por tanto concluyen que la proteína FASTKD4 se encuentra dentro de la matriz mitocondrial (ver **figura 51**) y allí se asocia con los mtRNAs para estabilizarlos y aumentar su tiempo de vida media contribuyendo al correcto funcionamiento del metabolismo de RNA mitocondrial (97).

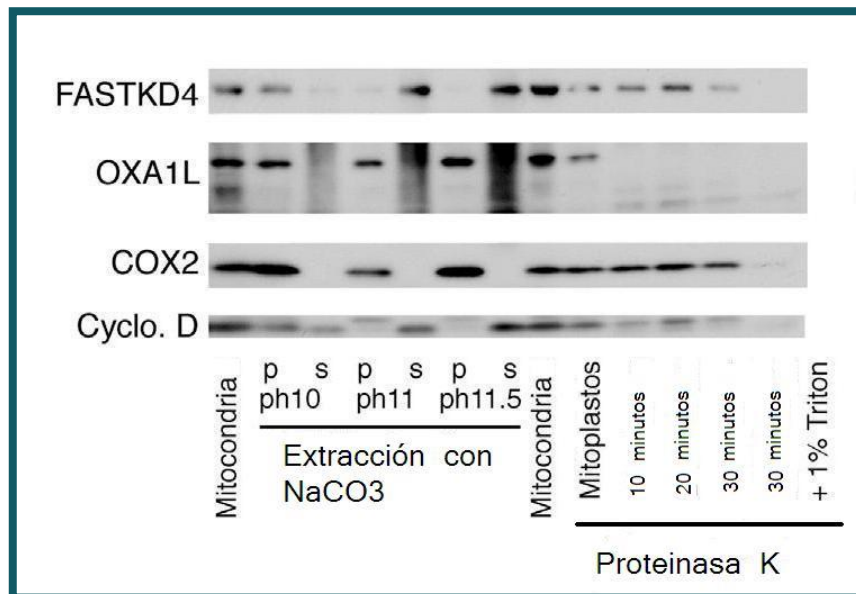


Figura 51: Western blot representativo de la presencia de FASTKD4, OXA1L, COX2 y ciclofilina D en mitocondrias aisladas con extracción de carbonato y digestión de mitoplastos con proteinasa K. Figura adaptada de Wolf 2014.

Los gránulos de RNA mitocondriales son dinámicos y están en constante proceso de ensamblaje y desensamblaje y por los hallazgos científicos más recientes son primordiales para la biogénesis de los ribosomas mitocondriales. FASTKD2 está presente en estos gránulos y aunque no es esencial para su conformación si que es necesario para el ensamblaje de los ribosomas mitocondriales junto a unas helicasas llamadas DDX28 y DHX30 (98). En el caso de FASTKD5 se ha demostrado que es esencial para madurar los transcritos mitocondriales que no están flanqueados por tRNA (98).

La mayoría de los mRNA y rRNA mitocondriales en el transcrito primario están separados entre sí por uno o más tRNA, que actúan como señales de escisión. Sin embargo, existen cuatro transcritos mitocondriales no flanqueados por tRNA tanto en sus extremos 5' y 3': tres transcritos codificados en la cadena pesada COX I, ATP8/6-COX III y ND5-CYTB y en la cadena ligera el transcrito de ND6. Antonicka y colaboradores demuestran que FASTKD5 es esencial para el procesamiento de los tres transcritos codificados en la cadena pesada y la ausencia de FASTKD5 provoca una acumulación de éstos (ver **figura 52-A**) (98).

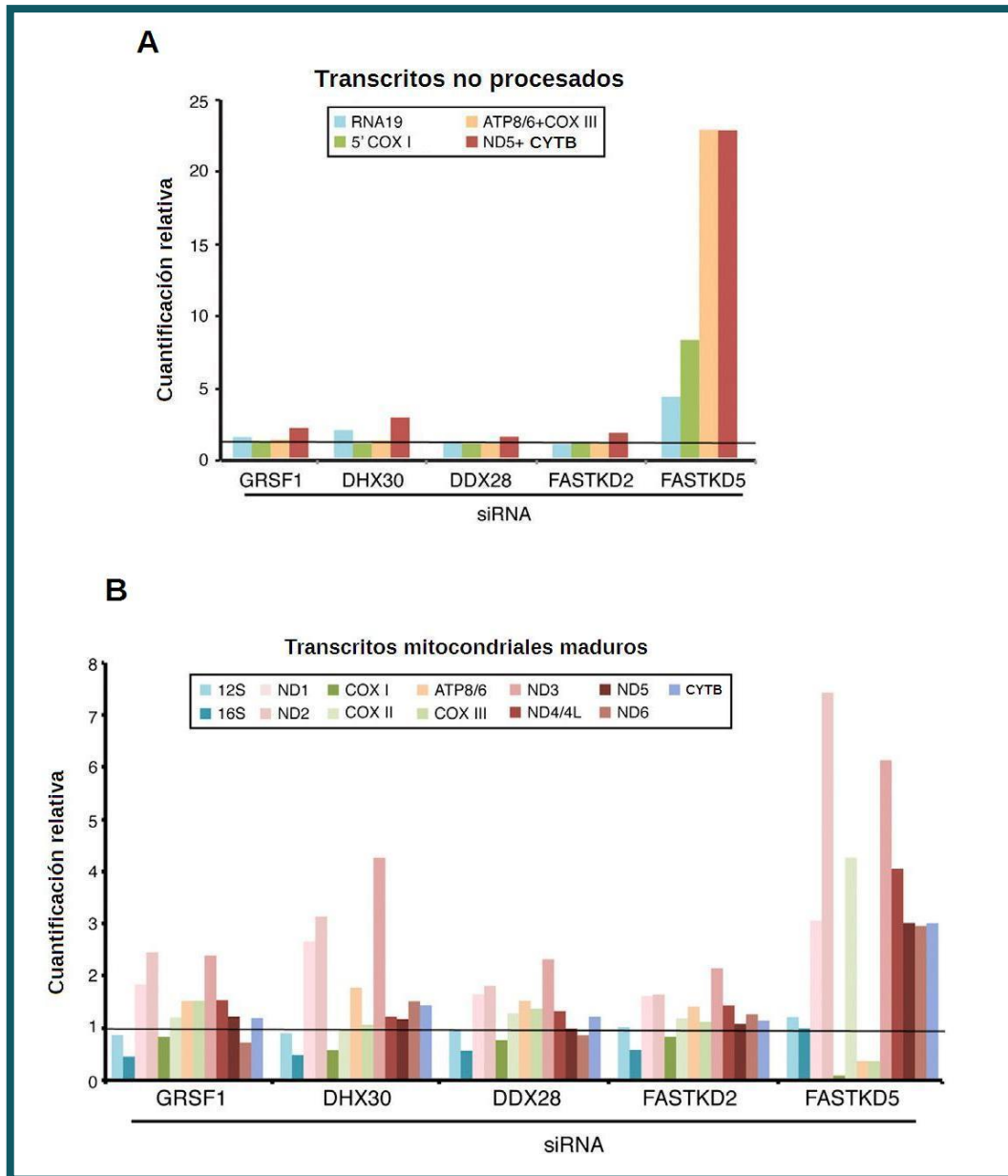


Figura 52: Cuantificación relativa de precursores de mRNA mitocondriales en células con FASTKD5 silenciado. (A) Cuantificación relativa de transcritos mitocondriales no procesados. (B) Cuantificación relativa de transcritos mitocondriales maduros. Las barras representan la media de dos experimentos independientes para las células tratadas con siRNA para GRSF1, DHX30, DDX28 y FASTKD2. Figura adaptada de Antonicka, 2015.

Curiosamente, el efecto sobre los niveles de los transcritos maduros difiere para cada uno de los precursores, que van desde prácticamente indetectable (mRNA de COX I) a 30% de los niveles de control (COX III y ATP8/6) a tres veces superior (ND5 y CYTB) (ver **figura 52-B**). No se sabe si FASTKD5 tiene actividad nucleasa para procesar los transcritos o si necesita la participación de otras proteínas (98), por lo que sucesivas investigaciones continuarán profundizando los mecanismos de regulación mitocondrial.

En resumen, FAST, FASTKD2 y FASTKD5 se encuentran en granulos mitocondriales, FASTKD4 en la matriz mitocondrial y FASTKD1 y FASTKD3 en las mitocondrias sin especificar aún detalles más precisos. FASTKD2, FASTKD3 y FASTKD4 participan en la respiración mitocondrial. FAST modula la actividad de los degradasomas para generar mRNA maduro de la proteína ND6 del complejo I mitocondrial. FASTKD2 es necesario para el ensamblaje de los ribosomas mitocondriales. FASTKD4 estabiliza los transcritos de mtRNA de COX2, ND3 y COX1 y retrasa su degradación, por lo que participa del funcionamiento del complejo IV mitocondrial. FASTKD5 es esencial para la maduración de los transcritos mitocondriales no flanqueados por tRNA excepto el transcrito ND6 que depende de FASTKD4. Así que a la luz de los hallazgos científicos hasta ahora realizados los miembros de la familia de proteínas FAST tienen funciones específicas y esenciales en el metabolismo RNA postranscripcional y la biogénesis ribosomal para contribuir con el correcto funcionamiento de la respiración mitocondrial y por ende de la función esencial de las mitocondrias que es la producción de energía. Casi todas las células de un organismo tienen mitocondrias y cuando se produce un daño, deterioro o disfunción mitocondrial afecta a todo el organismo.

Las enfermedades mitocondriales causan el mayor daño a órganos con requerimientos energéticos altos y con mayor dependencia del metabolismo mitocondrial como el cerebro, el corazón, el hígado, el músculo esquelético, el páncreas y el riñón; así que el espectro clínico y la edad de comienzo de las enfermedades mitocondriales varían ampliamente. Las enfermedades mitocondriales siguen siendo las grandes desconocidas ya que pueden estar causadas por mutaciones heredadas o adquiridas en el DNA mitocondrial, por mutaciones en genes nucleares que codifican para proteínas implicadas en el correcto funcionamiento de la mitocondria o bien por causas tóxicas. La implicación de la disfunción mitocondrial en las enfermedades clínicas ya conocidas ó en las enfermedades raras sigue en intenso proceso de investigación . En efecto, se ha evidenciado que en varias enfermedades autoinmunes, como lupus y artritis reumatoide, los niveles de mRNA de FAST están elevados (80), (81). En cáncer de páncreas, cáncer epitelial de ovario y astrocitoma también hay sobreexpresión de FAST (83), (84) y (84). Por el contrario, la ausencia de FAST en los gránulos de estrés citoplasmáticos disminuye la producción de mediadores proinflamatorios (78) así como disminuyen los signos inflamatorios en un modelo murino de artritis (82).

Sin lugar a dudas, el mejor conocimiento de los mecanismos biológicos de esta nueva familia de proteínas mitocondriales contribuirá al mejor entendimiento de la patogenia de enfermedades mitocondriales heredadas y adquiridas. Asimismo, nuestros estudios de

aclaramiento bacteriano y su relación con la respiración mitocondrial permitirán un mejor conocimiento de la interrelación entre el sistema endocrino - metabólico y el sistema inmune innato y determinará el mecanismo biológico por el cual FAST modula la fagocitosis lo que podría identificar nuevas dianas terapéuticas para el control de las infecciones y sus efectos celulares.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La ausencia de FAST provoca incremento de la fagocitosis bacteriana en macrófagos peritoneales de ratón tanto *in vitro* como *in vivo*.
2. Los macrófagos FAST KO tienen aumentado el contenido de la F-actina durante la fagocitosis.
3. FAST no modifica ni la maduración celular ni la expresión de los receptores TLR2 y TLR4.
4. El silenciamiento de FAST también provoca incremento de la fagocitosis en macrófagos humanos.
5. FAST no modifica la producción de ROS celular.
6. La actividad bactericida de los macrófagos es independiente de FAST.

SUGERENCIAS

SUGERENCIAS

- Explorar si la fagocitosis de otros restos celulares está alterado (hongos, células muertas, células infectadas) en ausencia de FAST.
- Generar células KO para cada uno de los homólogos de FAST en células THP-1 mediante un método de ingeniería genética de reciente introducción; y así estudiar la función de todos los genes de la familia en la capacidad fagocítica de los macrófagos y su importancia en la cadena respiratoria mitocondrial. El método consiste en una novedosa técnica de manipulación genética basada en el sistema inmune procariota CRISPR/Cas, considerada como uno de los descubrimientos más importantes de 2013. El sistema CRISPR/Cas de las bacterias permite detectar la secuencia genética que el fago ha infectado, cortarla y sustituirla por fragmentos de DNA sanos y operativos y también incorporar en su propio DNA fragmentos del DNA exógeno/material genético exógeno con el objeto de que sirvan de guía para evitar futuras invasiones. Este sistema procariota que ofrece increíbles aplicaciones médicas se ha comenzado a utilizar muy recientemente en células eucariotas para la generación de células y animales transgénicos (135), (136).
- Comprobar si las características estructurales de las bacterias gram negativas y gram positivas y/o los mecanismos de defensa pueden explicar las diferencias en la fagocitosis de las mismas.
- Comprobar si el aumento de F-actina en los macrófagos KO se debe sólo a un aumento de la actividad fagocítica o hay otros mecanismos que estimulan un aumento de la cantidad.
- Estudiar los cambios de la expresión génica de FAST y sus homólogos en células mononucleares periféricas de pacientes con septicemia bacteriana y estudiar su posible valor como marcadores pronósticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Berkow R. Manual Merck: Home edition. Second ed. 0, editor. 0: Océano; 2008.
2. Rich RR. Clinical Immunology, Principles and Practice. 4 ed. Robert R. Rich TAF, William T. Shearer, Harry Schroeder, Anthony J. Frew, Cornelia M. Weyand editor 2012.
3. Leonardo Fainboim JG. Introducción a la Inmunología Humana. 5 ed: Mc. Graw Hill; 2005.
4. Agerberth B, Gudmundsson GH. Host antimicrobial defence peptides in human disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;306:67-90.
5. Moreau JM, Girgis DO, Hume EB, Dajcs JJ, Austin MS, O'Callaghan RJ. Phospholipase A(2) in rabbit tears: a host defense against *Staphylococcus aureus*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Sep;42(10):2347-54.
6. Hankiewicz J, Swierczek E. Lysozyme in human body fluids. *Clin Chim Acta*. 1974 Dec 17;57(3):205-9.
7. Abul K. Abbas AHL, Shiv Pillai. Cellular and Molecular Immunology. 7 ed: ELSEVIER; 2012.
8. David Male JB, David B. Roth, Ivan M. Roitt. Immunology. 8 ed: ELSEVIER; 2013.
9. Zhang X, Mosser DM. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J Pathol*. 2008 Jan;214(2):161-78.
10. Valdes Rodríguez YC, Bilbao Díaz M, León Álvarez JL, Merchan González F. Origen e importancia de la fosfolipasa A2 de secreción. *Revista Cubana de Farmacia*. 2002;36(2):121-8.
11. Ortega-Gomez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med*. 2013 May;5(5):661-74.
12. Nunes P, Demaux N. The role of calcium signaling in phagocytosis. *J Leukoc Biol*. 2010 Jul;88(1):57-68.
13. Barton CH, Biggs TE, Baker ST, Bowen H, Atkinson PG. Nramp1: a link between intracellular iron transport and innate resistance to intracellular pathogens. *J Leukoc Biol*. 1999 Nov;66(5):757-62.
14. Gutiérrez-Salinas J, Morales-González J. Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño al hepatocito. *Med Int Mex*. 2004;20:287-95.
15. Agramonte-Hevia J, Gonzalez-Arenas A, Barrera D, Velasco-Velazquez M. Gram-negative bacteria and phagocytic cell interaction mediated by complement receptor 3. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002 Dec 13;34(4):255-66.
16. Stuart LM, Ezekowitz RA. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity*. 2005 May;22(5):539-50.
17. Ren Y, Ding Q, Zhang X. Ficolins and infectious diseases. *Viol Sin*. 2014 Feb;29(1):25-32.
18. Jeong E, Lee JY. Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. *Yonsei Med J*. 2011 May;52(3):379-92.
19. Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, Saulnier V, Merck E, Tancredi S, et al. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol*. 2005 Mar 1;174(5):2942-50.

20. Pietrocola G, Arciola CR, Rindi S, Di Poto A, Missineo A, Montanaro L, et al. Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*. *Int J Artif Organs*. 2011 Sep;34(9):799-810.
21. Piao W, Ru LW, Piepenbrink KH, Sundberg EJ, Vogel SN, Toshchakov VY. Recruitment of TLR adapter TRIF to TLR4 signaling complex is mediated by the second helical region of TRIF TIR domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Nov 19;110(47):19036-41.
22. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, et al. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*. 2002 Dec 15;169(12):6668-72.
23. Kong L, Ge BX. MyD88-independent activation of a novel actin-Cdc42/Rac pathway is required for Toll-like receptor-stimulated phagocytosis. *Cell Res*. 2008 Jul;18(7):745-55.
24. Tissieres P, Pugin J. The role of MD-2 in the opsonophagocytosis of Gram-negative bacteria. *Curr Opin Infect Dis*. 2009 Jun;22(3):286-91.
25. Zanoni I, Granucci F. Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 3:32.
26. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 2003 Aug 1;301(5633):640-3.
27. Fournier B. The function of TLR2 during staphylococcal diseases. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;2:167.
28. Shi L, Takahashi K, Dundee J, Shahroor-Karni S, Thiel S, Jensenius JC, et al. Mannose-binding lectin-deficient mice are susceptible to infection with *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med*. 2004 May 17;199(10):1379-90.
29. Ip WK, Takahashi K, Moore KJ, Stuart LM, Ezekowitz RA. Mannose-binding lectin enhances Toll-like receptors 2 and 6 signaling from the phagosome. *J Exp Med*. 2008 Jan 21;205(1):169-81.
30. Kraal G, van der Laan LJ, Elomaa O, Tryggvason K. The macrophage receptor MARCO. *Microbes Infect*. 2000 Mar;2(3):313-6.
31. Schafer G, Guler R, Murray G, Brombacher F, Brown GD. The role of scavenger receptor B1 in infection with *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *PLoS One*. 2009;4(12):e8448.
32. Amiel E, Nicholson-Dykstra S, Walters JJ, Higgs H, Berwin B. Scavenger receptor-A functions in phagocytosis of *E. coli* by bone marrow dendritic cells. *Exp Cell Res*. 2007 Apr 15;313(7):1438-48.
33. Pluddemann A, Hoe JC, Makepeace K, Moxon ER, Gordon S. The macrophage scavenger receptor A is host-protective in experimental meningococcal septicaemia. *PLoS Pathog*. 2009 Feb;5(2):e1000297.
34. Peiser L, Makepeace K, Pluddemann A, Savino S, Wright JC, Pizza M, et al. Identification of *Neisseria meningitidis* nonlipopolysaccharide ligands for class A

- macrophage scavenger receptor by using a novel assay. *Infect Immun.* 2006 Sep;74(9):5191-9.
35. Azad AK, Rajaram MV, Schlesinger LS. Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics. *J Cytol Mol Biol.* 2014 Jan 10;1(1).
 36. Lefevre L, Lugo-Villarino G, Meunier E, Valentin A, Olganier D, Authier H, et al. The C-type lectin receptors dectin-1, MR, and SIGNR3 contribute both positively and negatively to the macrophage response to *Leishmania infantum*. *Immunity.* 2013 May 23;38(5):1038-49.
 37. Kerscher B, Willment JA, Brown GD. The Dectin-2 family of C-type lectin-like receptors: an update. *Int Immunol.* 2013 May;25(5):271-7.
 38. Furukawa A, Kamishikiryo J, Mori D, Toyonaga K, Okabe Y, Toji A, et al. Structural analysis for glycolipid recognition by the C-type lectins Mincle and MCL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Oct 22;110(43):17438-43.
 39. Zhang P, Li Y, Xia J, He J, Pu J, Xie J, et al. IPS-1 plays an essential role in stress granule formation induced by dsRNA through interacting with PKR and mediating its activation. *J Cell Sci.* 2014 Mar 21.
 40. Wilmanski JM, Petnicki-Ocwieja T, Kobayashi KS. NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases. *J Leukoc Biol.* 2008 Jan;83(1):13-30.
 41. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):821-32.
 42. Hernandez JC, Latz E, Urcuqui-Inchima S. HIV-1 induces the first signal to activate the NLRP3 inflammasome in monocyte-derived macrophages. *Intervirology.* 2014;57(1):36-42.
 43. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature.* 2011 Jan 13;469(7329):221-5.
 44. Chen KW, Schroder K. Antimicrobial functions of inflammasomes. *Curr Opin Microbiol.* 2013 Jun;16(3):311-8.
 45. Sagulenko V, Thygesen SJ, Sester DP, Idris A, Cridland JA, Vajjhala PR, et al. AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC. *Cell Death Differ.* 2013 Sep;20(9):1149-60.
 46. Cooper GM, Hausman RE. *The Cell: a Molecular Approach.* 6 ed. Cooper GM, Hausman RE, editors. Bostón: Sinauer Associates; 2013.
 47. Helmut Plattner JH. *Biología celular.* 4 ed: MEDICA PANAMERICANA; 2014.
 48. Kapus A, Janmey P. Plasma membrane--cortical cytoskeleton interactions: a cell biology approach with biophysical considerations. *Compr Physiol.* 2013 Jul;3(3):1231-81.
 49. Park H, Chan MM, Iritani BM. Hem-1: putting the "WAVE" into actin polymerization during an immune response. *FEBS Lett.* 2010 Dec 15;584(24):4923-32.
 50. Rougerie P, Miskolci V, Cox D. Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: role and regulation of the actin cytoskeleton. *Immunol Rev.* 2013 Nov;256(1):222-39.
 51. Monypenny J, Chou HC, Banon-Rodriguez I, Thrasher AJ, Anton IM, Jones GE, et al. Role of WASP in cell polarity and podosome dynamics of myeloid cells. *Eur J Cell Biol.* 2010 Feb-Mar;90(2-3):198-204.

52. Mehta H, Glogauer M, Becart S, Altman A, Coggeshall KM. Adaptor protein SLAT modulates Fc γ receptor-mediated phagocytosis in murine macrophages. *J Biol Chem*. 2009 May 1;284(18):11882-91.
53. Moller J, Luhmann T, Chabria M, Hall H, Vogel V. Macrophages lift off surface-bound bacteria using a filopodium-lamellipodium hook-and-shovel mechanism. *Sci Rep*. 2013;3:2884.
54. Masters TA, Pontes B, Viasnoff V, Li Y, Gauthier NC. Plasma membrane tension orchestrates membrane trafficking, cytoskeletal remodeling, and biochemical signaling during phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jul 16;110(29):11875-80.
55. Liebl D, Griffiths G. Transient assembly of F-actin by phagosomes delays phagosome fusion with lysosomes in cargo-overloaded macrophages. *J Cell Sci*. 2009 Aug 15;122(Pt 16):2935-45.
56. Rojas MNC. Efecto de la fagocitosis, la infección por *Leishmania amazonensis* y *Leishmania braziliensis* sobre la distribución de filamentos de actina y microtúbulos en macrófagos murinos. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2010.
57. Stanley AC, Wong CX, Micaroni M, Venturato J, Khromykh T, Stow JL, et al. The Rho GTPase Rac1 is required for recycling endosome-mediated secretion of TNF in macrophages. *Immunol Cell Biol*. 2014 Mar;92(3):275-86.
58. Jennings RT, Knaus UG. Rho family and Rap GTPase activation assays. *Methods Mol Biol*. 2014;1124:79-88.
59. Li SN, Wang W, Fu SP, Wang JF, Liu HM, Xie SS, et al. IL-21 modulates release of proinflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:548073.
60. Vaudaux P, Waldvogel FA. Gentamicin antibacterial activity in the presence of human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother*. 1979 Dec;16(6):743-9.
61. Rojas-Espinosa O, Arce-Paredes P. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias Tercera parte. *Bioquímica*. [Revisión]. 2004;29(2 Abril-Junio):55-67.
62. Mulder R, Banete A, Basta S. Spleen-derived macrophages are readily polarized into classically activated (M1) or alternatively activated (M2) states. *Immunobiology*. 2014 Oct;219(10):737-45.
63. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*. 2010;5(1):e8668.
64. Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res*. 2007 Jan;56(1):45-50.
65. Rey-Giraud F, Hafner M, Ries CH. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS One*. 2012;7(8):e42656.
66. Beyer M, Mallmann MR, Xue J, Staratschek-Jox A, Vorholt D, Krebs W, et al. High-resolution transcriptome of human macrophages. *PLoS One*. 2012 7(9):e45466.

67. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008;13:453-61.
68. Duluc D, Corvaisier M, Blanchard S, Catala L, Descamps P, Gamelin E, et al. Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. *Int J Cancer.* 2009 Jul 15;125(2):367-73.
69. Labonte AC, Tosello-Tramont AC, Hahn YS. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. *Mol Cells.* 2014 Apr;37(4):275-85.
70. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008 Dec;8(12):958-69.
71. Van den Bossche J, Laoui D, Morias Y, Movahedi K, Raes G, De Baetselier P, et al. Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 genes differentially associate with distinct types of anti-inflammatory macrophages in vitro and with parasite- and tumour-elicited macrophages in vivo. *Scand J Immunol.* 2012 Jun;75(6):588-98.
72. Liu YC, Zou XB, Chai YF, Yao YM. Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int J Biol Sci.* 2014;10(5):520-9.
73. Cassetta L, Cassol E, Poli G. Macrophage polarization in health and disease. *ScientificWorldJournal.* 2011;11:2391-402.
74. Lee I, Hong W. RAP--a putative RNA-binding domain. *Trends Biochem Sci.* 2004 Nov;29(11):567-70.
75. Simarro M, Gimenez-Cassina A, Kedersha N, Lazaro JB, Adelmant GO, Marto JA, et al. Fast kinase domain-containing protein 3 is a mitochondrial protein essential for cellular respiration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Oct 22;401(3):440-6.
76. Jourdain AA, Koppen M, Rodley CD, Maundrell K, Gueguen N, Reynier P, et al. A mitochondria-specific isoform of FASTK is present in mitochondrial RNA granules and regulates gene expression and function. *Cell Rep.* 2015 Feb 24;10(7):1110-21.
77. Simarro M, Giannattasio G, De la Fuente MA, Benarafa C, Subramanian KK, Ishizawar R, et al. Fas-activated serine/threonine phosphoprotein promotes immune-mediated pulmonary inflammation. *J Immunol.* 2010 May 1;184(9):5325-32.
78. Simarro M, Mauger D, Rhee K, Pujana MA, Kedersha NL, Yamasaki S, et al. Fas-activated serine/threonine phosphoprotein (FAST) is a regulator of alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jul 3;104(27):11370-5.
79. Izquierdo JM, Valcarcel J. Fas-activated serine/threonine kinase (FAST K) synergizes with TIA-1/TIAR proteins to regulate Fas alternative splicing. *J Biol Chem.* 2007 Jan 19;282(3):1539-43.
80. Brutsche MH, Brutsche IC, Wood P, Brass A, Morrison N, Rattay M, et al. Apoptosis signals in atopy and asthma measured with cDNA arrays. *Clin Exp Immunol.* 2001 Feb;123(2):181-7.
81. Maas K, Chan S, Parker J, Slater A, Moore J, Olsen N, et al. Cutting edge: molecular portrait of human autoimmune disease. *J Immunol.* 2002 Jul 1;169(1):5-9.
82. Simarro M, Chen M, De la Fuente MA, Eiros JM, Orduna A, Anderson P. Deletion of FAST (Fas-activated serine/threonine phosphoprotein) ameliorates immune complex arthritis in mice. *Mod Rheumatol.* 2015 Nov 7:1-3.

83. Bauer A, Kleeff J, Bier M, Wirtz M, Kayed H, Esposito I, et al. Identification of malignancy factors by analyzing cystic tumors of the pancreas. *Pancreatology*. 2009;9(1-2):34-44.
84. Yoon J, Kim ES, Lee SJ, Park CW, Cha HJ, Hong BH, et al. Apoptosis-related mRNA expression profiles of ovarian cancer cell lines following cisplatin treatment. *J Gynecol Oncol*. 2010 Dec 30;21(4):255-61.
85. Zhi F, Zhou G, Shao N, Xia X, Shi Y, Wang Q, et al. miR-106a-5p inhibits the proliferation and migration of astrocytoma cells and promotes apoptosis by targeting FASTK. *PLoS One*. 2013;8(8):e72390.
86. Loh SH, Francescut L, Lingor P, Bahr M, Nicotera P. Identification of new kinase clusters required for neurite outgrowth and retraction by a loss-of-function RNA interference screen. *Cell Death Differ*. 2008 Feb;15(2):283-98.
87. Colas E, Perez C, Cabrera S, Pedrola N, Monge M, Castellvi J, et al. Molecular markers of endometrial carcinoma detected in uterine aspirates. *Int J Cancer*. 2011 Nov 15;129(10):2435-44.
88. Wang J, Mi JQ, Debernardi A, Vitte AL, Emadali A, Meyer JA, et al. A six gene expression signature defines aggressive subtypes and predicts outcome in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2015 Jun 30;6(18):16527-42.
89. Ghezzi D, Saada A, D'Adamo P, Fernandez-Vizarra E, Gasparini P, Tiranti V, et al. FASTKD2 nonsense mutation in an infantile mitochondrial encephalomyopathy associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Hum Genet*. 2008 Sep;83(3):415-23.
90. Pyle A, Smertenko T, Bargiela D, Griffin H, Duff J, Appleton M, et al. Exome sequencing in undiagnosed inherited and sporadic ataxias. *Brain*. 2015 Feb;138(Pt 2):276-83.
91. Garzon I, Perez-Kohler B, Garrido-Gomez J, Carriel V, Nieto-Aguilar R, Martin-Piedra MA, et al. Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012 Jun;18(6):408-19.
92. Yeung KT, Das S, Zhang J, Lomniczi A, Ojeda SR, Xu CF, et al. A novel transcription complex that selectively modulates apoptosis of breast cancer cells through regulation of FASTKD2. *Mol Cell Biol*. 2011 Jun;31(11):2287-98.
93. Das S, Yeung KT, Mahajan MA, Samuels HH. Fas Activated Serine-Threonine Kinase Domains 2 (FASTKD2) mediates apoptosis of breast and prostate cancer cells through its novel FAST2 domain. *BMC Cancer*. 2014;14:852.
94. Sekar S, McDonald J, Cuyugan L, Aldrich J, Kurdoglu A, Adkins J, et al. Alzheimer's disease is associated with altered expression of genes involved in immune response and mitochondrial processes in astrocytes. *Neurobiol Aging*. 2015 Feb;36(2):583-91.
95. Ramanan VK, Nho K, Shen L, Risacher SL, Kim S, McDonald BC, et al. FASTKD2 is associated with memory and hippocampal structure in older adults. *Mol Psychiatry*. 2015 Oct;20(10):1197-204.
96. Ramanan VK, Saykin AJ. FASTKD2 and human memory: functional pathways and prospects for novel therapeutic target development for Alzheimer's disease and age-associated memory decline. *Pharmacogenomics*. 2015;16(5):429-32.

97. Wolf AR, Mootha VK. Functional genomic analysis of human mitochondrial RNA processing. *Cell Rep.* 2014 May 8;7(3):918-31.
98. Antonicka H, Shoubridge EA. Mitochondrial RNA Granules Are Centers for Posttranscriptional RNA Processing and Ribosome Biogenesis. *Cell Rep.* 2015 Feb 12.
99. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Dec 7;96(25):14459-63.
100. Howie D, Laroux FS, Morra M, Satoskar AR, Rosas LE, Faubion WA, et al. Cutting edge: the SLAM family receptor Ly108 controls T cell and neutrophil functions. *J Immunol.* 2005 May 15;174(10):5931-5.
101. Leijh PC, van Zwet TL, ter Kuile MN, van Furth R. Effect of thioglycolate on phagocytic and microbicidal activities of peritoneal macrophages. *Infect Immun.* 1984 Nov;46(2):448-52.
102. Dhiman R, Kathania M, Raje M, Majumdar S. Inhibition of bfl-1/A1 by siRNA inhibits mycobacterial growth in THP-1 cells by enhancing phagosomal acidification. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Apr;1780(4):733-42.
103. Laroux FS, Romero X, Wetzler L, Engel P, Terhorst C. Cutting edge: MyD88 controls phagocyte NADPH oxidase function and killing of gram-negative bacteria. *J Immunol.* 2005 Nov 1;175(9):5596-600.
104. Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med.* 2013;45:e66.
105. Tummers B, Goedemans R, Jha V, Meyers C, Melief CJ, van der Burg SH, et al. CD40-mediated amplification of local immunity by epithelial cells is impaired by HPV. *J Invest Dermatol.* 2014 Dec;134(12):2918-27.
106. Donis-Maturano L, Sanchez-Torres LE, Cerbulo-Vazquez A, Chacon-Salinas R, Garcia-Romo GS, Orozco-Urbe MC, et al. Prolonged exposure to neutrophil extracellular traps can induce mitochondrial damage in macrophages and dendritic cells. *Springerplus.* 2015;4:161.
107. Wang J, Yao Y, Xiong J, Wu J, Tang X, Li G. Evaluation of the Inflammatory Response in Macrophages Stimulated with Exosomes Secreted by Mycobacterium avium-Infected Macrophages. *Biomed Res Int.* 2015;2015:658421.
108. Silberman D, Bucknum A, Bartlett T, Composto G, Kozlowski M, Walker A, et al. CD28 ligation increases macrophage suppression of T-cell proliferation. *Cell Mol Immunol.* 2012 Jul;9(4):341-9.
109. Hou TZ, Qureshi OS, Wang CJ, Baker J, Young SP, Walker LS, et al. A transendocytosis model of CTLA-4 function predicts its suppressive behavior on regulatory T cells. *J Immunol.* 2015 Mar 1;194(5):2148-59.
110. Soloviev DA, Hazen SL, Szpak D, Bledzka KM, Ballantyne CM, Plow EF, et al. Dual role of the leukocyte integrin alphaMbeta2 in angiogenesis. *J Immunol.* 2014 Nov 1;193(9):4712-21.
111. Lischke T, Heesch K, Schumacher V, Schneider M, Haag F, Koch-Nolte F, et al. CD38 controls the innate immune response against *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 2013 Nov;81(11):4091-9.

112. Lissner D, Schumann M, Batra A, Kredel LI, Kuhl AA, Erben U, et al. Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2015 Apr 21.
113. Rodgaard-Hansen S, Rafique A, Christensen PA, Maniecki MB, Sandahl TD, Nexø E, et al. A soluble form of the macrophage-related mannose receptor (MR/CD206) is present in human serum and elevated in critical illness. *Clin Chem Lab Med*. 2014 Mar;52(3):453-61.
114. Ohto U, Fukase K, Miyake K, Shimizu T. Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 8;109(19):7421-6.
115. Zhu F, Zhou Y, Jiang C, Zhang X. Role of JAK-STAT signaling in maturation of phagosomes containing *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*. 2015;5:14854.
116. Scholl D, Adhya S, Merrill C. *Escherichia coli* K1's capsule is a barrier to bacteriophage T7. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Aug;71(8):4872-4.
117. West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature*. 2011 Apr 28;472(7344):476-80.
118. Forscher P, Lin CH, Thompson C. Novel form of growth cone motility involving site-directed actin filament assembly. *Nature*. 1992 Jun 11;357(6378):515-8.
119. Yamaguchi H, Fujimoto T, Nakamura S, Ohmura K, Mimori T, Matsuda F, et al. Aberrant splicing of the milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) gene in human systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol*. 2010 Jun;40(6):1778-85.
120. Malik M, Simpson JF, Parikh I, Wilfred BR, Fardo DW, Nelson PT, et al. CD33 Alzheimer's risk-altering polymorphism, CD33 expression, and exon 2 splicing. *J Neurosci*. 2013 Aug 14;33(33):13320-5.
121. Zabala SM-E. *Respiración Celular*. In: Lassalle SMyA, editor. <http://www.genomasur.com/lecturas/Guia09.htm>. Argentina 2015.
122. Chen YC, Rutter J. Pressing mitochondrial genetics forward. *Cell Rep*. 2014 May 8;7(3):599-600.
123. Han CZ, Ravichandran KS. Metabolic connections during apoptotic cell engulfment. *Cell*. 2011 Dec 23;147(7):1442-5.
124. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature*. 2013 Apr 11;496(7444):238-42.
125. Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, Blagih J, Amiel E, DeBerardinis RJ, et al. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood*. 2010 Jun 10;115(23):4742-9.
126. Rodriguez-Prados JC, Traves PG, Cuenca J, Rico D, Aragonés J, Martín-Sanz P, et al. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J Immunol*. 2010 Jul 1;185(1):605-14.
127. Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Peleato ML, Pérez-Martos A, Enriquez JA. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell*. 2008 Nov 21;32(4):529-39.

128. Lapuente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acin-Perez R, Latorre-Pellicer A, Colas C, Balsa E, et al. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science*. 2013 Jun 28;340(6140):1567-70.
129. Jourdain A, Koppen M, Martinou J-C. Characterization of the mitochondrial isoform of FASTK. *The FASEB Journal*. 2011;2011(25).
130. Popow J, Alleaume AM, Curk T, Schwarzl T, Sauer S, Hentze MW. FASTKD2 is an RNA-binding protein required for mitochondrial RNA processing and translation. *RNA*. 2015 Nov;21(11):1873-84.
131. Park D, Han CZ, Elliott MR, Kinchen JM, Trampont PC, Das S, et al. Continued clearance of apoptotic cells critically depends on the phagocyte Ucp2 protein. *Nature*. 2011 Sep 8;477(7363):220-4.
132. Emre Y, Nubel T. Uncoupling protein UCP2: when mitochondrial activity meets immunity. *FEBS Lett*. 2010 Apr 16;584(8):1437-42.
133. Jourdain AA, Koppen M, Wydro M, Rodley CD, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM, et al. GRSF1 regulates RNA processing in mitochondrial RNA granules. *Cell Metab*. 2013 Mar 5;17(3):399-410.
134. Bogenhagen DF, Martin DW, Koller A. Initial steps in RNA processing and ribosome assembly occur at mitochondrial DNA nucleoids. *Cell Metab*. 2014 Apr 1;19(4):618-29.
135. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013 Feb 15;339(6121):819-23.
136. Heigwer F, Kerr G, Boutros M. E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nat Methods*. 2014 Feb;11(2):122-3.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A-1

Ubicación y límites de las secuencias de direccionamiento mitocondrial y los dominios FAST_1, FAST_2 y RAP en proteínas FAST y FASTKD humanos.

Gene name	Accession number		MTS (aa)	FAST_1 (aa)	FAST_2 (aa)	RAP (aa)
FAST	Q14296	515 aa	1-38	243-309	319-410	449-502
FASTKD1	Q53R41	847 aa	1-41	575-643	657-743	779-837
FASTKD2	Q9NYY8	710 aa	1-68	456-528	538-619	636-692
FASTKD3	Q14CZ7	662 aa	1-29	408-478	489-580	593-650
FASTKD4	Q969Z0	631 aa	1-19	369-439	449-536	566-620
FASTKD5	Q7L8L6	764 aa	1-27	430-500	509-602	699-758

aa: amino-acid

MTS: mitochondrial targeting sequence

FAST_1: FAST kinase-like protein, subdomain 1; pfam06743

FAST_2: FAST kinase-like protein, subdomain 2; pfam08368

RAP: RAP domain; pfam08373

Anexo A-2

Alineación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas humanas FAST y FASTKD1-5. Los residuos están coloreados según el tipo: aminoácido polar no cargado (verde), aminoácido ácido (rojo), aminoácido básico (azul) y aminoácido no polar (amarillo).

FAST	-----		
FASTKD1	MKKT	PVFL	ESLV
FASTKD2	-----	MLTTLK	PF
FASTKD3	-----		
FASTKD4	-----		
FASTKD5	-----	MAATLKS	7
FAST	-----	MLRVLLSAQT	12
FASTKD1	AILSEK	QVGC	AFML
FASTKD2	LVSTSR	TMRL	CCLG
FASTKD3	-----	MALITL	LRKN
FASTKD4	-----	MAAHLV	KRCT
FASTKD5	LKLVRY	RAFCS	PSAF
FAST	ARLSGL	LLIIPP	59
FASTKD1	LVVTOQ	FAGE	AHDP
FASTKD2	GISTLT	TALRI	ERLL
FASTKD3	ERLCPW	LCSR	QPEP
FASTKD4	ARQAPAM	APVG	72
FASTKD5	RILTTSS	AHPGL	EFSK
FAST	-----	SPGELL	RWLQ
FASTKD1	HRNLET	-----	TQDL
FASTKD2	ISSRKL	-----	EECN
FASTKD3	SQMFYR	RLSN	LTSS
FASTKD4	DHLIKK	-----	ATRPE
FASTKD5	VHSYNAS	ETSQ	LLSV
FAST	-----	PPVEQV	TLOD
FASTKD1	KFLRN	VRYR	YQPL
FASTKD2	FEKRL	MF	SHPA
FASTKD3	LPKEI	LENS	IFQAL
FASTKD4	KGLLI	QDAH	FQLL
FASTKD5	HPVLL	GSTS	FALL
FAST	-----	SDGPLV	CALE
FASTKD1	MIPLCN	HPAS	FVLF
FASTKD2	QNTILV	QTLR	VTQER
FASTKD3	POSSLL	LNVA	RCQN
FASTKD4	KASKEL	QSVE	QVWR
FASTKD5	HSHSML	DVYET	KCCH
FAST	-----	KPPP	161
FASTKD1	SCLIKR	VTSV	LHKH
FASTKD2	VHVLRT	GFRI	LV
FASTKD3	ELINQ	LQGE	KLET
FASTKD4	QELLA	ELLT	HLERR
FASTKD5	PFLNIF	SSYL	NLHW
FAST	LOPLL	RGGQ	LEAA
FASTKD1	VSVLV	RAIS	LLPSP

```

FASTKD2      SQHMEFVLAAMNHR----- 358
FASTKD3      ISQMLTALVVDQS----- 310
FASTKD4      LRKVLVMLAAQSR----- 271
FASTKD5      VGTICLGFFKSSTN----- 332

FAST         SCPRFLRYPROHLISSLAEAR-----PEELTPHV 205
FASTKD1      QLKLLQKLDHYGRQLQHSNSLDLLRKEKLSLKGNTFPESLLEMIATLOHFMDINYNIN 535
FASTKD2      SLILLDECSKVVDNIHGCPLRIMINILQSCKDLOYHNLDLDFKGLADYVAATFDIWKFRK 418
FASTKD3      AFPLTIKLGKYVVRHVPHTNEELRRVLEAFIYFGHHDFFTKALHRVAAVCLTLDPEV 370
FASTKD4      SVPLLRAISYHLVQKPFSLTKDVLLDVAYAYGKLSFHQTOVSRQLATDLSLMPSLTSGE 331
FASTKD5      SEFVMRKIGDLACANIQHLSSRSLVNIVKMFRTFVLDHINFMKQIGIAPORIPSLGVQG 392
:

FAST         MVLLAQHLARHRLREPOLLEAIAHFVVQETQLSSKVVOKLVLPFGRLN--YLP--LEQQ 261
FASTKD1      VGEIASFISSTDYLTSTLLLDRIASVAVQQIEKIHPFTIPAIRPFSVLN--YDPPQRDEF 593
FASTKD2      VLFILILFENLGFRRVGLMDLFMKRIVEDPESLNMKNILSILHTYSSLNHVYKCONKEQF 478
FASTKD3      VCRVMEYCSRELIILSKPILNAVAETFCQTEKFSRQISALMEPFGRLN--YLPPNASAL 428
FASTKD4      VAHCAKSFALLKWLSPLPFEAFAQHVLNRAQDITLPHLCSVLLAFARLN--FHPDQEDQF 389
FASTKD5      VMHLTLYCSALRFLNEGVMNAVAASLPPRVAHCRSKDVAKILWSFGTLN--YKPPNAEEF 450
:
:
:

FAST         FMPCLERILAREAGVA--PLATVNIILMSLCQLRCLPFRALHFVFSPGFINYISG--TPHA 317
FASTKD1      LGTCVQHLNSYLGILD--PFILVFLGFSLATLEYFPEDLLKAIKFNKIFLARLDSOLEIIS 651
FASTKD2      VEVMASALTGYLHTIS--SENLLDAVYSFCLMNYFPLAPFNQLLQKDIISELLTSDDMKN 536
FASTKD3      FRKLENVLFTHFNYP--PKSLLKLLHSCSLNECHPVNFLAKIFKPLFLORLOGKESHLD 486
FASTKD4      FSLVHEKLGSELPGLE--PALQVDLVWALCVLQQAAREAELOAVLHPFPHIQFLGGKSQKD 447
FASTKD5      YSSLISEIHRKMPFENQYPEHLPTCLLGLAFLEYFPVELIDFALSPGFVRLAQERTK-- 510
:
:
:

FAST         L----IVRRYLSLLDTAVELELPGYRGPRLPRRQVPIFPQPLITRARCXYSHKDIVAE 373
FASTKD1      PPSARVQFHLMELNRSVCLECEPFQIPWFHDR----FCQOYNKIGGMDGTQQQIFKM 706
FASTKD2      A----YKLHTLDTCLKLDTVLVRDIALSLP----QLPRELPSSHTNAKVAEVLSS 584
FASTKD3      T----LSRAQLTQLFLASVLECPFYKGPKLLPKYQVKSFLTTPCCSLETVPVDSQLRYRVKI 542
FASTKD4      C----NTFQKLLHINATALLEYPFYSGP--LLPASAVAPGPSALDRKVIPLQKELQETLKG 502
FASTKD5      ---DLLKELYTLDTGVGIECPDYRGNRLSTHLQOEGSELLWYLARKDMNSKPEFLETV 563
*
:
:
:

FAST         GLRQ--LLGEE--KYRQDLTVPPGYCTDFLLCASSS--GAVLPVR----- 412
FASTKD1      -LAE--VLGGINCVKASVLTPTYHKVDFECILDKR--KKPLPYG----- 745
FASTKD2      ---LLGGEQGHFSKDVHLPNHYHIDFEIRMDTNRNQVLPSS----- 621
FASTKD3      GLTN--LLGARLYFAPKVLTPTYCYTIDVEIKLDEE--GFVLPS----- 581
FASTKD4      ---LLGSADKGSLEVATQYGWVLDAEVLLSD--GEFLPV----- 537
FASTKD5      FLLTLMGGPQYVKHHMILPHTRSSLEVLQDVN--LKPLPFNREATPAENVAKLRLEHVG 622
:
**
:
*
:

FAST         -----TQDPFLYPPRSCPOGOAASS----- 433
FASTKD1      -----SHNIALGQLPEMPWESNIIVG----- 767
FASTKD2      -----DVD----- 624
FASTKD3      -----DVD----- 584
FASTKD4      -----RDFVAPH-----LAQPTGS----- 551
FASTKD5      VSLTDDL MNKLLK GKARGHFQKTESEPGQOPMELENKAAVPLGGFLCNVADKSGAMEMAG 683

FAST         ----ATTRDPAQRVVLVLRERWHFCRDGRVLLGSRALRERHLCGLMGYQLLPLPFEELE-- 487
FASTKD1      ----SRLPPGAERIALEFLDSKALCRNIPHMKGKSAMKRRHLEILGYRVIQISQFEWNSM 823
FASTKD2      ----TTSATDIQRVAVLCVRSAYCLGSSHPRGFLAMKMRHLNAMGFHVLVNNWEMD-- 678
FASTKD3      ----TANEDIHKRIALCIDGPKRFCSNSKHLLGKEAIKORHLQLLYQVVOIPYHEIG-- 635
FASTKD4      ----QSPPPGSKRLAFLRWEFPNFNSRSKDLLGRFVLARRHIVAAGFLIVDVPFYEWL-- 605
FASTKD5      LCPAACMOTPRMKLAVQFTNRNQCYGSRDLLGLHMKRRQLARLGYRVVVELSYWEWLP 743
:
:
:
*
:
**
:
*
:

FAST         SQRGLPOLKSYLROKLOALGLRWGPEGG----- 515
FASTKD1      ALSTKDARMDYLRECFGEVKSCLE----- 847
FASTKD2      -KLEMEDAVTFLKTKIYSVEALPVAAVNVQSTQ 710
FASTKD3      MLKSRRELVEYLQRKLFSONTVHWLQE----- 662
FASTKD4      ELKSEWOKGAYLKRMRKAVAEELAK----- 631
FASTKD5      LKRTIRLEKLAFLHEKVFTSAL----- 764
*:
:

```

Anexo A-3

Alineación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas FAST y FASTKD1-5 humana (Hsa), ratón (Mmu), pollo (Gga), y pez cebra (Dro). Los residuos están coloreados según el tipo: aminoácido polar no cargado (verde), aminoácido ácido (rojo), aminoácido básico (azul) y aminoácido no polar (amarillo).

1	Hsa FAST	-----
	Mmu FAST	-----
	Gga FAST	-----
	Dre FAST	-----MLGLPVRFSLVASRRFSSPHQPSCLLSLGLALASMYTTRMYSSGGGKPGRRIGLMGGGPPMLENH
	Hsa FASTKD1	-----MLRLRAICPFSWRVVFQFRPISCEPLIIQM
	Mmu FASTKD1	-----MFRLRISILLSWRAPLRFPSCESLITQM
	Gga FASTKD1	-----MLCLROVCLSAALRRYOARTLSSDLLLSQI
	Hsa FASTKD2	-----
	Mmu FASTKD2	-----
	Gga FASTKD2	-----
	Dre FASTKD2	-----
	Hsa FASTKD3	-----
	Mmu FASTKD3	-----
	Gga FASTKD3	-----
	Dre FASTKD3	-----
	Hsa FASTKD4	-----
	Mmu FASTKD4	-----
	Gga FASTKD4	-----
	Dre FASTKD4	-----
	Hsa FASTKD5	-----MAATLKSLLKLVRYRAFCSPSA
	Mmu FASTKD5	MALVVCRRFTGSEFCGTFPCPPLMKPROTRTCDFAITAKKIS-----TDSRMSAALKLLEPLKYKAPCNP-A
	Gga FASTKD5	MAITVLIRRRFPRLSRVTTFLTTAKCKAKRESNKSQKQKEENPEPTNSRPESTATTIQLLDPSPDYRVLYNPSA
	Dre FASTKD5	-----
71	Hsa FAST	-----
	Mmu FAST	-----
	Gga FAST	-----
	Dre FAST	HHHHHPLHPVHQPOSYPAVYPARLDAHRPHYQTHQVYHTHPPVVAHLPPPHYQPHALHHSKKTWNFI
	Hsa FASTKD1	NKCTDEEQMFGFIERNKAILSEKQVGCADFMLWKLOKQKTSLLKNAEYVRDHPQFLTLHNLATNKFKLMN
	Mmu FASTKD1	QKCTNEEQVFDLIETNTATLSEQQVGCANVLWQFQKQKTVLEKNVDHVRNHPOFLTLCSITTNHNPAMS
	Gga FASTKD1	NNCTHEDEVFSLVGRNKARLSEKRVGIALNVLWQLOKPKPLLRRTSDYVRNHSQFLTLCLFLENKVEHMD
	Hsa FASTKD2	-----MLTTLKPFQSVSVSEKMNKAGSFFWNLRFSTLVSTSRMRLCCLGLCKPKIVHSNWNILN
	Mmu FASTKD2	-----MNSKARSLLTIR-RFSTLLPRSRALRIDPLGTCRPEVIHNSKWNPRN
	Gga FASTKD2	-----MGYLLNAVRYLR-RCSFVPRPSAPTSRHVVWVGRHRDCLDNTNCRN
	Dre FASTKD2	-----MNVYKSGLDMLRLALKSTSPWKCDSFIRTOASSCYKIIISIVASPOLGRNTHSEFKQ
	Hsa FASTKD3	---MALITLTKNLYRLSDFOMHRALAAALKNKPLNHVHKVVKERLCPWLCSRQPEPFQVGFHHAHCKKFHS
	Mmu FASTKD3	---MAFITLRRAFCHKSIWIPGAVVALKIHPASHAPKAVTDRLSVCFCSLQPELFRVRFHHAACKNFHS
	Gga FASTKD3	-----
	Dre FASTKD3	---MVTLEFMAKTLALRLRVLSLLDYQILKACAGKPLSSPFLOTYTGCFFPFCFSFHSARAVCTTERDPLFLA
	Hsa FASTKD4	-----MAAHLVKRC-----TCLLREAAARQAPAMAPVGRRLAWVAHKT
	Mmu FASTKD4	-----MAVRLMKRC-----TCLLREATRIVPTVAVPVGRLRLAGVSCKT
	Gga FASTKD4	-----MAARLVQRCCWRHLAFTCSFAAAFAALLLPSGKASAAARALPHP
	Dre FASTKD4	-----MTTRLLCRWAR---WFPRSPRTATASARLQTSIVHHTPLCLM
	Hsa FASTKD5	FGAVRSVSYWNVS-STQHGQDPEPHISLCHSAKKVKNICSTFSSRRILTTSSAHPGLEFSKTSSSKAST
	Mmu FASTKD5	YRAAQVAHWHMGNITPHGGQTLPECNSSCHLARKVKVNGGTTLPRTFTASSAHLGLEFNKASTLNAST
	Gga FASTKD5	YAKSRAASQOASAARSQSALTD-----DSTNTGTSKVQHTFTTTSQAALPPVRNALPKPKPHLQKTIIPAR-
	Dre FASTKD5	-----
141	Hsa FAST	-----
	Mmu FAST	-----
	Gga FAST	-----
	Dre FAST	HEKMSYDIFFTMKRLIDRSRSVDEVLRVVTQNPQKISHNHYPIALQKICQLLVLHQAGGQAG
	Hsa FASTKD1	DDTLVNVLYVTQOFAGEAHDPLVEALVTEAWRRLERFDIKLLSEFSSCLADQHLVFSPLMGKIAIDIVHRN

Mmu FASTKD1 **D**ATLV**D**VLYSI**K**QFAVE**S**HHPLIEALVTEAWKRLERFD**T**NVLSIFSTCLAD**Q**HLYF**S**PLMCKI**A**DIVNRR
Gga FASTKD1 **N**ETIV**D**TL**S**VLRL**S**VE**S**H**S**DL**A**GLV**L**TEAWKRL**E**SL**S**LPAL**S**K**F**AL**C**HL**K**Q**H**R**F**S**P**L**T**G**K**I**A**H**L**V**D**M**K**
Hsa FASTKD2 **N**F**H**N**R**M**O**S**--****T**D**I**I**R****V**L**F**O**D**A**F**I**K**S**D**V**G**-**F**O**T**K**G**-**I**S**T**L**T**A**L**R**I**E**R**L**L**Y**A**K**R**L**F**F**D**S**K**O**S**L**V**P**V**D**K**S**D**D
Mmu FASTKD2 **H**R**L**N**V**F**D**E**G**L**Q**P**S**V**R**Y**L**F**O**D**I**F**I**S**K**S**V**D**G**C**I**O**T**K**G**-**I**S**H**S**A**V**F**K**P**D**R**L**L**C**P**R**R**L**S**F**D**A**K**H**S**F**V**S**D**G**T**S**D**H
Gga FASTKD2 **L**F**L**N**A**F**P**S**L**R**G**S**P**L**R**F**L**S**H**K**A**D**A**F**G**V**G**D**E**V**O**O**E**K**S**R**E**A**A**V**S**E**Q**A**O**S**S**L**E**L**K**E**G**D**A**O**S**F**R**V**K**A**L**D**E**N
Dre FASTKD2 **I**R**F**Y**S**Q**H**S**S**Q**D**A**V**D**L**Q**V**K**O**T**T**E**A**F**E**V**S**D**Q**A**D**S**T**P**F**S**A**H**L**Q**K**C**S**C**P**T**D**V**L**D**A**V**K**O**F**P**A**S**O**N**D**-----
Hsa FASTKD3 **K**N**G**N**D**L**H**P**L**G**G**P**V**F**S**Q**V**S**D**C**D**R**L**E**O**N**V**K**N**E**E**S**O**M**F**Y**R**R**L**S**N**L**T**S**E**E**V**L**S**F**I**S**T**M**E**T**L**P**D**-----
Mmu FASTKD3 **E**K**G**N**D**F**H**P**V**G**E**P**W**S**S**Q**A**O**E**W**N**O**P**Q**S**L**O**N**E**D**E**M**L**F**R**R**L**S**Y**F**T**S**F**E**V**L**S**F**I**S**A**L**D**T**L**P**V**-----
Gga FASTKD3 **L**S**V**N**E**T**V**H**L**C**G**D**T**G**S**S**A**Q**A**R**E**R-----**W**M**D**E**Q**V**F**F**R**L**L**K**S**L**H**T**S**Q**E**I**F**K**F**L**R**C**L**E**V**M**S**D-----
Dre FASTKD3 **S**G**S**V**R**P**Y**O**E**L**C**L**S**G**S**G**L**S**L**M**H**Y**L**S-----**S**N**E**D**H**A**F**M**K**R**L**S**S**C**S**T**S**Q**O**V**L**H**L**L**R**S**Y**S**V**L**S**S-----
Hsa FASTKD4 **L**T**S**S**A**T**S**P**I**S**H**L**P**G**S**L**M**E**P**V**E**K**E**R**A**S**T**P**Y**-**I**E**K**O**V**D**H**L**I**K**K**A**T**R**P**E**L**L**L**L**G**S**H**D**L**D**S**-----
Mmu FASTKD4 **L**T**S**S**V**S**S**P**S**S-----**G**S**L**A**E**L**L**G**K**E**Q**V**F**T**P**Y**P**E**H**Q**E**L**D**F**L**I**E**K**A**S**R**P**E**Q**L**L**E**L**L**G**S**D**H**S**L**H**H**-----
Gga FASTKD4 **P**P**A**S**I**H**T**S**V**P**S**T**W**N**A**D**R**F**S**V**K**E**Q**V**E**N**S**N**S**E**H**R**V**I**L**N**L**E**A**A**T**S**P**O**E**L**F**O**L**G**-**E**L**H**S**L**N**S-----
Dre FASTKD4 **I**L**S**W**I**R**P**S**V**R**H**--**L**C**O**G**N**E**L**A**K**I**D**E**G**T**V**P**Y**E**R**T**K**L**I**K**L**V**E**K**A**S**T**P**D**E**V**L**Q**L**W**-**D**O**H**G**T**G**T**-----
Hsa FASTKD5 **L**Q**L**G**S**P**R**A**T**G**V**D**E**D**V**E**V**F**D**S**F**E**N**M**R**V**F**L**Q**L**R**P**E**Y**R**V**H**S**Y**N**A**S**E**T**S**Q**L**L**S**V**S**E**G**E**L**I**L**H**K**V**R**-----
Mmu FASTKD5 **L**H**P**D**S**S**S**A**G**G**G**-**E**E**D**V**E**V**F**D**S**F**E**G**T**R**V**L**K**L**R**P**E**Y**Q**L**H**S**Y**N**R**S**D**T**H**O**P**I**A**A**S**E**V**E**L**I**L**H**K**V**T**-----
Gga FASTKD5 **L**S**A**A**Q**T**R**K**E**E**A**E**M**D**K**A**E**M**H**D**S**K**E**D**P**R**M**F**O**O**G**R**E**Y**R**T**L**S**Y**D**K**F**E**P**I**E**A**L**P**P**E**G**D**S**I**L**H**S**I**P-----
Dre FASTKD5 -----**M**T**H**D**I**S**O**R**S**S**T**S**D**L**N**E**A**L**V**I**L**N**K**V**T**-----

211

Hsa FAST -----
Mmu FAST -----
Gga FAST -----
Dre FAST -----
Hsa FASTKD1 **L**E**T**T**O**D**L**S**S**L**S**V**L**M**V**N**I**S**S**L**I**S**R**H**F**O**O**L**V**N**K**T**E**L**L**F**D**I**D**S**S**E**V**N**V**A**K**S**I**A**K**F**L**R**N**V**R**Y**R**Y**O**P**L**L**E**R**C**N
Mmu FASTKD1 **L**E**T**I**O**D**L**R**A**L**S**V**L**M**V**S**I**S**S**L**I**S**P**C**F**O**E**R**L**V**I**R**T**E**L**L**F**D**I**V**N**S**S**K**V**N**I**A**R**R**I**L**L**F**L**R**N**V**K**Y**S**H**V**P**L**L**E**R**C**N
Gga FASTKD1 **L**S**I**O**D**I**R**I**L**S**V**L**M**I**S**V**S**D**V**I**S**R**S**F**O**R**L**L**O**K**V**D**O**L**L**G--**E**G**V**H**F**N**Y**A**K**R**I**V**O**F**L**Q**L**S**K**L**H**S**P**L**L**E**K**C**N**
Hsa FASTKD2 **E**L**K**K**V**N**L**---**N**H**E**V**S**N**E**D**V**L**T**K**E**T**K**P**N**R**I**S**S**R**K**L**S**E**E**C**N**
Mmu FASTKD2 **D**L**K**K**I**N**F**---**H**H**T**S**S**-**E**D**V**F**T**K**K**V**R**P**T**P**V**N**Y**K**K**L**A**Q**E**C**N**
Gga FASTKD2 -----**E**Q**F**F**N**R-----**L**H**T**C**A**
Dre FASTKD2 -----
Hsa FASTKD3 -----
Mmu FASTKD3 -----
Gga FASTKD3 -----
Dre FASTKD3 -----
Hsa FASTKD4 -----
Mmu FASTKD4 -----
Gga FASTKD4 -----
Dre FASTKD4 -----
Hsa FASTKD5 -----
Mmu FASTKD5 -----
Gga FASTKD5 -----
Dre FASTKD5 -----

281

Hsa FAST -----**M**L**R**V**L**L**S**
Mmu FAST -----**M**L**R**I**L**L**S**
Gga FAST -----**M**W**K**D**K**L**L**S**H**
Dre FAST -----**G**A**A**G**G**G**A**E**G**V**L**A**A**S**S**A**A**G**G**S**G**E**N**T**V**R**Q**I**L**D**N**O**D**F**O**T**L**C**D**A**I**V**N**D**C**S**K**F**D**N**F**
Hsa FASTKD1 **N**V**F**L**S**N**V**D**H**L**D**L**S**I**S**K**I**L**S**V**K**F**L**Q**F**N**S**F**E**F**I**I**M**A**K**K**L**T**E**M**I**P**L**C**N**H**P**A**S**F**V**K**L**F**V**A**L**G**P**I**A**G**P**E**E**K**K**
Mmu FASTKD1 **Q**V**F**I**R**N**M**S**H**L**D**L**E**S**I**S**K**I**L**N**L**Y**Q**F**L**Q**H**S**F**E**F**V**E**A**A**R**G**R**L**A**E**M**L**P**S**D**H**P**E**S**F**V**R**L**F**A**A**L**G**P**V**A**R**P**E**I**K**K
Gga FASTKD1 **K**I**F**L**K**S**T**S**H**L**D**L**D**N**I**S**L**I**F**G**L**Y**E**Q**L**G**F**D**A**E**F**R**L**T**A**K**Q**L**L**S**E**S**V**D**D**Y**C**D**P**E**A**F**A**K**L**F**V**L**G**P**M**A**E**S**K**V**R**E
Hsa FASTKD2 **-**S**L**S**D**V**L**D**A**F**S**K**A**P**T**--**F**P**S**S**N**Y**F**T**A**M**W**T**I**A**K**R**L**S**D**D**Q**R**F**E**K**R**L**M**F**S**H**P**-**A**F**N**Q**L**C**E**H**M**M**R**E**A**K**I**M**O**Y**K
Mmu FASTKD2 **-**S**L**S**D**V**L**D**T**F**S**K**A**P**T**--**F**P**G**S**N**Y**F**L**A**M**W**I**A**K**R**I**S**E**D**K**R**R**F**R**Q**L**M**F**S**H**P**-**A**F**N**Q**L**C**E**O**M**M**R**E**A**K**I**M**H**Y**D**
Gga FASTKD2 **-**C**P**S**D**V**L**D**L**A**S**E**S**A**V**S**I**K**O**F**T**N**C**L**T**T**I**W**K**L**L**R**S**M**S**D**D**O**R**R**Y**E**K**R**L**V**F**E**H**P**-**A**F**V**R**L**C**Q**O**L**L**R**D**S**R**R**M**T**R**G
Dre FASTKD2 -----**L**S**S**I**F**S**R**M**R**E**S**T**K**K**M**T**A**E**Q**O**R**C**L**Q**L**M**F**E**H**P**-**G**F**R**E**V**C**E**R**V**S**D**A**W**R**M**R**C**D**
Hsa FASTKD3 -----**T**M**A**A**G**A**L**O**R**I**C**E**V**E**K**K**D**G**D**Q**L**P**K**E**I**L**E**N**S**-**I**F**Q**A**L**C**F**O**F**E**K**E**P**S**Q**L**S**N**T**
Mmu FASTKD3 -----**P**L**A**M**A**A**L**L**R**I**C**E**I**G**R**R**D**G**E**Q**R**L**P**E**G**V**L**E**N**R**-**A**F**Q**A**L**C**L**R**C**E**R**D**P**S**H**L**T**N**A
Gga FASTKD3 -----**I**M**A**S**A**G**A**L**O**R**I**C**E**V**E**V**D**C**D**G**L**K**N**P**E**D**V**L**E**N**E**-**V**F**R**A**L**C**F**O**F**E**F**S**S**K**L**S**N**T
Dre FASTKD3 -----**A**V**A**A**S**I**L**H**R**L**A**D**L**E**H**D**A**P**E**K**S**--**W**S**Y**L**S**D**V**-**A**F**N**K**L**C**O**R**L**E**D**N**S**A**E**L**E**N**E**
Hsa FASTKD4 -----**N**O**A**A**M**V**L**I**R**L**S**H**L**L**S**E**K**P**E**D**K**G**L**L**I**Q**D**A**-**H**F**H**Q**L**L**C**L**L**N**S**Q**I**A**S**V**W**H**G
Mmu FASTKD4 -----**N**H**A**A**L**I**L**I**R**L**S**Y**L**L**S**E**K**P**K**E**K**A**L**A**E**D**A**-**R**F**O**R**L**V**K**L**V**D**S**O**I**T**C**V**W**H**G**
Gga FASTKD4 -----**N**O**A**S**L**V**V**T**R**L**S**R**L**A**V**E**K**K**L**E**T**G**D**I**L**Q**D**E**-**R**F**Q**O**L**I**E**I**V**D**S**Q**I**S**Q**V**W**N**N
Dre FASTKD4 -----**S**E**A**R**C**L**I**Q**L**N**L**R**V**V**E**K**G**S**K**G--**V**L**L**D**P**-**R**C**K**S**M**O**D**T**L**N**T**O**L**S**T**V**W**N**G**
Hsa FASTKD5 -----**V**N**O**N**N**L**O**A**Q**V**I**D**V**L**C**L**K**L**S**L**P**A**E**Q**H**P**V**L**L**G**S**T**S**F**A**L**L**C**Q**L**S**V**K**K**I**O**L**F**D**T**O**
Mmu FASTKD5 -----**F**Y**O**N**K**L**O**P**E**V**I**T**N**Y**F**Y**K**L**S**S**L**P**A**E**Q**N**S**V**L**L**S**S**N**S**F**A**L**L**C**Q**L**S**V**K**N**I**O**L**F**N**T**S
Gga FASTKD5 -----**I**S**K**G**S**H**S**P**G**T**V**T**D**F**C**K**L**S**H**L**P**V**E**Q**H**A**E**L**M**I**D**H**R**E**N**T**L**C**C**A**I**E**N**I**O**S**F**S**T**S
Dre FASTKD5 -----**I**L**K**N**M**G**A**S**D**I**T**S**F**L**H**K**L**S**Q**I**P**L**K**O**T**A**V**V**R**R**D**P**R**F**S**M**L**L**Q**Y**S**V**A**I**I**H**T**F**T**P**O**

351

Hsa FAST AQTSPARLSGLLL-IP---PVQPCCLGPSKWDLR--PVGGGPPSAGPVQGLORLLEQAKSPG-ELLRWLGG
Mmu FAST AQTSPARLSGLLL-IP---PVQPCCLGPSKSGDR--PFGGGP----VOGLORLLEQARSFG-ELLRWLGG
Gga FAST TGSSCFSLVLTLR-LPGESPLVRVLEDESRNRG--RFNOKDVMVFSSVMRLHPSSPHPL-VEESCLSSL
Dre FAST SIVNCLYAVAALG-LPSSDQIVQVLEESQARLS--QFNOKDISVMVFSSMKLHPSSQHPH-IEESCLAGL

Hsa FASTKD1 QLKSTMLLMSEDI-TGEQALAVLGGAMGDMESRNS--CLIKRVTSVLHKHLDGYKPLELLKITOELTFLHF
Mmu FASTKD1 QLKSTILLSEEL-SSQALIVLGGAMGDMESRNS--HLLKKIVSVLYKHLNDYKSIELLKIIQALTFLHF
Gga FASTKD1 RLLATAALIAEEF-SSHQALVILKTMQMKCRHS--QLLEKMVSVLHRRLDSYHVLOLVKLTQCLVLLHC

Hsa FASTKD2 YLLFSLHAIKVLG-IPQNTILVQTLRLVQERIN--ECDEICLSVLSVLEAMEPCKNVHVLRTG-FRIL
Mmu FASTKD2 HLLFSLNAIVKLG-IPQNTILVQTLRLVQERIN--ECDEICLSVLSVLEAMEPCKNVHVLRTG-FRIL
Gga FASTKD2 DLVFSLHAVVNLG-VPQNTLLVQTLRLVQERIN--QLDNRCMSVLAATLAGMDEKKNVSAQAG-LQLL
Dre FASTKD2 DLAYTLLAIINLG-VSQHTRIVQTLRLVQERIN--QFDNRSLSVLAAGIQOMENGNVQALREALGLLL

Hsa FASTKD3 SLVTALQALILH-VDPQSSLLLNVAECQNRRLRKGGMVVRNLCILGESLITLHSSGCVTLELIIINQLGG
Mmu FASTKD3 GLVTALQSLLLTLPADPQSSMLSLVAECQNRRLRQGNLEVVHLCVLESLAMLOGASCETLKLVVVRQLGS
Gga FASTKD3 GLLNALQALIRLR-IDPHSTLIASLLSECEERLANRRLTVDSLCSLGEISLLELVVPSCAMLEQIVSHMOE
Dre FASTKD3 VLVGALLSCTRLY-LGSRSSLVRLVLEECQKRLDSEKLNKVKVLCGISRASFALEGHDSGLVKQAMSQLOK

Hsa FASTKD4 TLSKLLGSLYALG-IPKASKELQSVQEVWRWRM--KLKYKHLAFLAESCATLSQEQHSQELLAE-LLTH
Mmu FASTKD4 TLVKLLRSLYTLV-LPQISKELQSVQEVWRWRM--RLKYKHLVFLAESCASFMEQHSQELLAE-LLMH
Gga FASTKD4 TLVGLLKSLSYLG-MESSSREMOSVEHEVLRRL--RLSFRQLASLAEFLAVKQCKES--KLLSE-VIKK
Dre FASTKD4 TLVGLLRLTLMGL-LPAHAPLLGAIQNEVLRIR--RLSYRHLSYLAQWVAFQRMKMGYENEVLTSTLLKQ

Hsa FASTKD5 DLINVLKAFVILG-IPHSMSMLDVEYTRCCHQVW--EMNMDQLLVADLWRVLRGRKVRPFLNIFSSYLLN
Mmu FASTKD5 DLISILKAFVILG-IPPSLSMLDVEYTRFCHQVW--EMTLDQLLVADLWRNLRGRVPRFFKIFFSYLLN
Gga FASTKD5 ELIDILKACVRLV-VPPIHPVLNACENEFRRVW--DMNLDQLLVADQWRCLGRSVPVSYLSILFSYANM
Dre FASTKD5 QLLDILKAFVNLG-LPRSHSVLASYEAHFCEQAS--EMNLHQLLAAQLWRCLVRNVPKYLKLYDNVSG

421

Hsa FAST NPSKVRRAHHYSVALRRRLGQLLGS----RPRPPVPEQVTLQDLS--OLIIRNCPSEFDIHTIHVCLHLAVLL
Mmu FAST NPTKVRRAHHYPVALRRRLGQLLVS----QPRPSVPEQATLQDLS--OLIIRNCPSEFDVHTIHVCLHLAVLL
Gga FAST ERHLEKRRHPQTLFLLLSYYRLR----AQALQG-HPASDQOLINNRKILRLVRHTLQGVVSAMRHEHELAL
Dre FAST EKNIERRRHPQTLFLLLSYYRTR----WRALRAADTASPEQLVVNRKILRLVKHTLASVSSVRHEMALL

Hsa FASTKD1 QRKEFFAKLRELLLSYLKNSFIP--TEVSVLVRRAISLLPSPHLEDEVGISRIEAVLPQCDLNNL--SSFATS
Mmu FASTKD1 QSKLEFMKLRRELLLSRLASVIP--SEISVLVSALSMLPHPLSETAVSRIEAVLPQCFREL--NDLVVY
Gga FASTKD1 RDQELFAKLMKMLLGLKSSVIP--SDTAAIIRTLAILPSSQVEEVIINKATAVLPQCRLODL--SCIAATA

Hsa FASTKD2 VDQQVWKIEDVFTLQVVMKCIQK--DAPIALKRRKLEMKALRELDRFVLSNSQHMFEVLAAMNH--RSLILL
Mmu FASTKD2 VDQQVWNKIHVFTLQVVMKCIQK--DAPSALKKKLEMKALRELDGRFVLSNSQHMFEVLAAMD--RSVVL
Gga FASTKD2 VQORLPSIRDIFILQNLKCMGK--DAPVFLKRRKLEMMAVLRIDHLYPNAHRVFLGLVAMNY--CSIPLV
Dre FASTKD2 KDR-VPEISNVVVLQNMRRAMGK--NSPKELKMLAIKTLSLADEFSPPTQVVFSLAAMD--NFKPLL

Hsa FASTKD3 EKLETFPEDIVALYRILQACTEKVDHQTFLNKNINFSLSIVSNLSPKLISQMLTALVVLDQSQAPFLI
Mmu FASTKD3 KSVETFAPEEITSVYRILQVCPPEVDKHMFLNLTNNFSISVVPYLSPKSISHVLTALVALDQTHALPLL
Gga FASTKD3 KDIENWSPREMAMVYKILQVVVGEREQYRDLNRMNSATLTIAVQLCPKFTSAILNSVALHQVQVPLI
Dre FASTKD3 TETAQWKAALVAVYCMATGLAEDVLYQDLLNEMNAQALRLVHQMDFEAVSKILGALVTLRQEQALPLV

Hsa FASTKD4 LERRWTEIEDSHTLVTVMMKVG---HLSEPLMNRLEDKCLELVEHFQPNELRKLVLVMLAAQSR--RSVPLL
Mmu FASTKD4 LERRWTEINDSRLVTVMMKVG---HLSEPLMNRLEDKCLELVEHFQPNELRKLVLVTLAAQSR--RSVPLL
Gga FASTKD4 LELRWTELEGTRTVVMLIAKVG---HISVLMNRLEDKALELAEQFSPEDIRRITLALAYQNR--RSVPLL
Dre FASTKD4 LELRWTELSDSRTITILMGRAS---LFTPSLMDKLEDKALELAEFSFTAEDMRRVALALASQNR--RAVPLL

Hsa FASTKD5 HWKDLSLSQLVHLIYVIGENRQV----SODLMQKLESILIKYIDLINLEEVTICLGFKSSSTNLSEFVM
Mmu FASTKD5 HWKELSLSQLIHLIYIIGENRQV----PQDLMQRLESILIKYVDSVNLEEVTICLGFKSSSSLSFVM
Gga FASTKD5 HWKELIPLVQLVYIIGEGRKS----PVDLMQKLESVILKYLDSCLEELGAICLGFKFSISGTSDFVM
Dre FASTKD5 NLNOMSPPELVQLIYIIGESRGC----PETLVKRSIESLLMRHNLKPEELGAVCLGLFKAQTSISERAV

491

Hsa FAST GFPSDGPLVCALEQERRRLRPPKPPPPLOPLLRGGQGLEAALSQPRFLRYP-----RQHLISSLAEARP
Mmu FAST GFPSDGPLLCALEQERRSRLPPKPPSPHRPAIYGGQRLVALSQRFLQYPP-----RQHLIRSLAEARP
Gga FAST ---DEMLALCAQEAANKA-- ----LEAIFSSQLFYENR-----QERFIRSMAGEG-
Dre FAST ---DEMLSACAREASNKS-- ----LELIFSSHLYFQNR-----QEKVSSSLAEELP

Hsa FASTKD1 VLRWIQHDHMY-IDNMTA-- ----KQKLLQKLDHYGRQRLQHSNSLDDLKELKSLK
Mmu FASTKD1 LMRWIQSDLVC-LASTTG-- ----KQDLLQKLDQLGRHRLQOSTNLDLWEEKLSLK
Gga FASTKD1 LVKWNHYDKLH-WONTSQ-- ----LHVKLLQKLVNDCGFQRLQKARNLNLLEELTHVN

Hsa FASTKD2 DECSKVVDNI-HGCPLR-- ----IMINILQSCKDLQYH-----NLDLFKGLADYVA
Mmu FASTKD2 NECSKVIDNV-HGCPFK-- ----VLISILQSCRDLRYC-----NEDLFKSAIEYVA
Gga FASTKD2 NACSKKIQENI-HDAPYW-- ----QLILILEACHSLOYR-----NIKLFSAIADYVN
Dre FASTKD2 NICKSKNIAENV-HEFPIS-- ----RLVMVLKSCYELQYR-----NYSLFPSSISEYMT

Hsa FASTKD3 IKLGGKVVVRHV-PHFTNE-- ----ELRRVLEAFIYFGHH-----DTFFTKALEHRVA
Mmu FASTKD3 IKLGGKVVVRYI-PRFTNE-- ----ELRKVLEAFVYFGHS-----DRFFTEALEQHVVS
Gga FASTKD3 LALCKHVSVKHV-PYFTSD-- ----ELASVLEAFVLFQHR-----EQIFTEALEKHVP

Dre FASTKD3 IALCKQAVHQV-QSFADA-- ---- ELTVVLSALMHFGHS----- DHFFVEALERVVP
Hsa FASTKD4 RAISYHLVQKP-FSLTKD-- ---- VLLQVAYAYGKLSFH----- QTQVSQRLAIDLL
Mmu FASTKD4 RAISYHLVQKP-FPMTKG-- ---- MLLDLAYAYGKLSFH----- QTQVSQRLAADLL
Gga FASTKD4 RAMSYHLIQKH-SELNLS-- ---- ILMDLIFAYGKLNHF----- QPQVFQKIATDLO
Dre FASTKD4 RALSYHLNOKPSFELKTP-- ---- LLLD IAYVYGKLNFS----- QTQFFKRLASELL
Hsa FASTKD5 RKIGDLACANIQHLSSRS-- ---- LVNIVKMFRTHTVD----- HINFMKQIGEIAP
Mmu FASTKD5 RKIGDLACANMQHLSSHT-- ---- LVHILKMFRETHVD----- HIHFMKQFGEIAP
Gga FASTKD5 RKIADRVSLMEDMGTYA-- ---- LVNVLKMLRYTRMD----- HLPPLRKLKGVVP
Dre FASTKD5 QRLVDRSLVVVKDMSDFG-- ---- IVNVMKYLRFESYLD----- HLPWLHAMGVEVP

351

Hsa FAST AQTSPARLSGLLL-IP---PVQPCCLGPSKWGDR--PVGGGPGSAGPVQGLQRLLEQAKSPG-ELLRWLQG
Mmu FAST AQTSPARLSGLLL-IP---PVQPCCLGPSKSGDR--PFGGGP----VQGLQRLLEQARS PG-ELLRWLSQ
Gga FAST TGSSCFSLVLTLR-LPGESPLVRVLEDESRRNLG--RFNOKQVSMVFSVMRHPSSPHPL-VESCLSSL
Dre FAST SILVNCIYAVAALG-LPSDSQIVQVLEERSQARLS--QFNOKDISMVFSSSMKLEHSSQHP-LIESCLAGL
Hsa FASTKD1 QLKSTMLLMSIDL-TGEQALAVLQAMGDMSRNS--CLIKRVTSVLHKHLDGYKPLELLKITOELTFLHF
Mmu FASTKD1 QLKSTILLSEEL-SSQOALIVLGAMEDMSRNS--HLLKKIVSVLYKHLDNYSIELLKKIIQALTFHF
Gga FASTKD1 RLLATAALIAEEF-SSHQALVILKTMQMKCRHS--QLEKMSVLRHRHDSYHVLQVVKLTQCLVLLHC
Hsa FASTKD2 NLLFSLHAIIVKLG-IPQNTILVQTLRLVTOERIN--ECDEICLSVLSVLEAMEPCKNVHVLRFQ-FRILL
Mmu FASTKD2 HLLFSLNAIVKLG-IPQNTLMVQTLRLVTOERIN--ECDERCLSILSTALVSMPECMNVNALRAG-LRILL
Gga FASTKD2 DLVFSLHAVVNLG-VPQNTLLVQTLRLVCOEKLN--QLDNRCMSVLATTLAGMDEDKNVSAQAG-LQLL
Dre FASTKD2 DLAYTLLAIINLG-VSQHTRIVQTLRLVVOERLN--QFDNRSLSVLAAGIQOMENGNVQALREALGLLL
Hsa FASTKD3 SLVTALQALILLH-VDPOSSLLLNVAECQNRRLRKGMEVRNLCILGESLITLHSSGCVLELIINQLOG
Mmu FASTKD3 GLVTALQSLITLTPADPOSSMLSLVACQRRLOQGNLEVVHHLQVLESLAMLOGASCETLKLVVVRQLOS
Gga FASTKD3 GLLNALQALIRLR-IDPHSTLIASLLSECEERLANRKLTVDSLCSLGESELLLEVPSCAMLEQIVSHMQE
Dre FASTKD3 VLVGALLSCTRLV-LGSRSSVLRLVLEECOKRLDSEKLNKVKVLCGISRASFALEGHDSGLVKQAMSQLQK
Hsa FASTKD4 TLKLLGSLYALG-IPKASKELQSVQEVWRWRMR--KLKYKHLAFLAESCATLSQEQHSQOELLAE-LLFH
Mmu FASTKD4 TLVKLLRSLYTLV-LPQISKELQSVQEVWRWRLR--RLKYKHLVFLAESFASFMKEQHSQOELLAE-LLMH
Gga FASTKD4 TLVGLLSLSYSLG-MESSSREMOSVEHEVLRWLR--RLSFRQLASLAEFLAVKQGGKES--KLLSE-VLKK
Dre FASTKD4 SLVGLLRITLMLG-LPAHAPLLGAIQNEVLWRIR--RLSYRHLSYLAWVAVQRMGYENEVLSTLLKQ
Hsa FASTKD5 DLINVLKAFVILG-IPHSMSLVYETKQCHOVW--EMNMDQLLVAIDLWRYLGRKVRPFLNIFSSYLNL
Mmu FASTKD5 DLISILKAFVILR-IPPSLSMLVYETFCHQOVW--EMTLDQLLVAIDLWRNLGRRVRFKFFSYLVN
Gga FASTKD5 ELIDILKACVRLV-VPPHVPVNLACENEFRRVW--DMNLDQLLVAIDCWRCLGRSVPVSYLSILFSYANM
Dre FASTKD5 QLLDILKAFVNLG-LPRSHSVLASYEAEFCEQAS--EMNLHQLLVAIDLWRCLVRNVKYLKLYDQVNSQ

421

Hsa FAST NPSKVRRAHHYSVALRRLGQLLGS----RPRPPPVEQVTLQDLS--QLIIRNCPSFDIHTIHVCLHLAVLL
Mmu FAST NPTKVRRAHHYPVALRRLGQLLVS----QPRPSPVEQATLQDLS--QLIIRNCPSFDVHTIHVCLHLAVLL
Gga FAST ERHLEKRRHPQTLFLLLSYYRLR----AQALQG-HPASDQQLINNRKILRLVRHTLGOVSAMRHEHALL
Dre FAST EKNIERERHPQTLFLLLSYYRTR----WRALRAADTASPEQLVNVNRKILRLVKHTLASVSSVRHEMALL
Hsa FASTKD1 QRKEFFAKLRELLLSYLKNSFIP--TEVSVLVRAISLLPSPHLEDEVGISRIEAVLPQCFLNLI--SSFAFS
Mmu FASTKD1 QSKELFMKLRLELLSRLEASVIP--SEISVLVLSALSMLPHPLSETAVSRIEAVLPQCDFREL--NDLVVY
Gga FASTKD1 RDQELFAKLMKLLGFLKSSVIP--SDTAARIITLAILPSSQVEEVIINKATAVLPQCRLODL--SCIAFA
Hsa FASTKD2 VDQQVWKIEDVFTLQVVMKCIQK--DAPIALKRRKLEMKALRELRFSVLNSQHMFEVLAAMNH--RSLIIL
Mmu FASTKD2 VDQQVWNKIHVFTLQVVMKCIQK--DAPSALKKKLEMKALKELGRFSILNSQHMFEVLAAMD--RSVLL
Gga FASTKD2 VEQRLPDIRDIFILQNLKCMGK--DAPVFLKRRKLEMAVLRIDHLYPNNAHRVFLGLVAMNY--CSIPVL
Dre FASTKD2 KDR-VPEISNVVVLQNMAMGK--NSPKELMQLAIKTSLSLADEFSPPNTQVFLSLAAMD--NFKPLL
Hsa FASTKD3 EKLETFTPEDIVALYRILQACTEKVDEHOTFLNKINNFSLSVNLSPKLISQMLTALVVLDQSQAFPLI
Mmu FASTKD3 KSVTEFAPEEITSVYRILQVCPPEVDKHMFLNLTNNFSISVVPYLSPKSISHVLTALVALDQTHALPLL
Gga FASTKD3 KDIEENWSPREMAVYKILQVVGEREQYRDLNRMNSATLTIAYQLCPKFTSAILNSLVALHQTQVVPIL
Dre FASTKD3 TETAQWKAELVAVYCMATGLAEDVLYQDLINEMNAQALRLVHQMDEPAVSKILGALVTLROEQALPLV
Hsa FASTKD4 LERRWTEIEDSHLVTVMKVG---HLSEPLMNRLEDKCLELVEHFGPNELRKVLVMLAAQSR--RSVPLL
Mmu FASTKD4 LERRWTEINDSRTLVTMTMAG---HLSESLMNHLEDKCLELVEQFGPDELKVLVTLAAQSR--RSVPLL
Gga FASTKD4 LELRWTELECTRIVVMLIAKVG---HISSVLMNRLEDKRALELAQFSPEDIRITLALAYQNR--RSVPLL
Dre FASTKD4 LELRWTELSDSRTITILMGRAS---LFTPLMDKLEDKRALELAESFTAEDMRRVALALASQNR--RAVPLL
Hsa FASTKD5 HWKDLSSQLVHLIYVIGENROV---SQDLMOKLESILIKYIDLINLEEVGTICLGFKSSSTNLSEFVM
Mmu FASTKD5 HWRELSLSQLIHLIYIIGENROV---PQDLMORLESILIKYVDSVNLEEVGTICLGFKSSSSLSSEFVM
Gga FASTKD5 HWKELTLPOLVQVYIIGEGRKS---PVDLMOKLESVILKYLDSCTEELGATCLGLFKSISGISDHWV
Dre FASTKD5 NLNQMSPPFLVQLIYIIGESRGC---PETLVKSIESLLMRHNLKPEELGAVCLGLFKAQTSLSERAV

491

Hsa FAST GFPSDGPLVCALEQERRRLRPPKPPPPLOPLLRGGQGLEAALSCPRFLRYP-----RQHLISSLAEARP
Mmu FAST GFPSDGPLLCALEQERRSRLPPKPPSPHRAIYGGORLEVALSCPRFLQYP-----RQHLIRSLAEARP
Gga FAST ---DEMLALCAQEAANKA-- ---- LEAIFSSQFLYENR-----QERFTRSMAGEG-
Dre FAST ---DEMLSACAREASNKS-- ---- LELIFSSHLFYQNR-----QEKVSSLAELP
Hsa FASTKD1 VLRWIQHDHMY-LDNMTA-- ---- KOLKLLQKLDHYGRQRLQHSNSLDDLKRELKSLK

Mmu FASTKD1 LMRWIQSDLVC-IASTTG-----KQLDLLQKLDQLGRHRLQOSTNLLDLEELKSLK
Gga FASTKD1 LVKWNHYDKLH-WQNTSQ-----LHVKLLQKVNDCGFORLOKARNLNLLEELTHVN
Hsa FASTKD2 DECSKVVDNI-HGCCPLR-----IMINILQSCKDLOYH-----NLDLQKGLADYVA
Mmu FASTKD2 NECSKVVDNI-HGCCPLR-----VLISILQSCRDRLRYQ-----NEDLQKSLAEYVA
Gga FASTKD2 NACSKKIQENI-HDAPVW-----QLLILILEACHSLOYR-----NIKLFSAVADYVN
Dre FASTKD2 NICKSKNIAENV-HEFPIS-----RLVMVLKSCVELOYR-----NYSLFSSISEYMT
Hsa FASTKD3 IKLGKVVVRHV-PHFTNE-----ELRRVLEAFIVFGHH-----DTFFTKALEHRVA
Mmu FASTKD3 IKLGKVVVRHI-PRFTNE-----ELRKVLEAFVYFGHS-----DRFFTEALEQOHS
Gga FASTKD3 LALCKHVSVKHV-PYFTSD-----ELASVLEAFLEFFGHR-----EQIFTEALEKHVP
Dre FASTKD3 IALCKQAVHQV-QSFADA-----ELTVVLSALMHFGHS-----DHFFVEALERYVP
Hsa FASTKD4 RAISYHLVQKP-FSLTKD-----VLLDVAYAYGKLSFH-----OTQVQSORLATDLL
Mmu FASTKD4 RAISYHLVQKP-FPMTKG-----MLLDLAYAYGKLSFH-----OTQVQSORLAADLL
Gga FASTKD4 RAMSYHLIQKH-SELNLS-----ILMDLIFAYGKLNHF-----QPOVFOKIATDLO
Dre FASTKD4 RALSYHLNOKPS-FELKTP-----LLLDIAYVYGKLNFS-----OTQVFKRLASELL
Hsa FASTKD5 RKIGDLACANIQHLSSRS-----LVNIVKMFRETHVD-----HINFMKQIGEIAP
Mmu FASTKD5 RKIGDLACANMQHLSSH-----LVHILKMFRETHVD-----HIHFMKQFGEIAP
Gga FASTKD5 RKIADRVSLMEDMGTYA-----LVNVLKMRLRYTRMD-----HLPPLRKLQKVVVP
Dre FASTKD5 QRLVDRSLVVVKDMSDFG-----IVNVMKYLRFYSYLD-----HLPWLEAMGVEVP

771

Hsa FAST -LLGEEKYRQDLTVPPGYCTDFLLCASSSGAVLPEVRT-----
Mmu FAST -LLGEEENYRONLTVPPGYCTDFLLCVSSSGAVLPMRT-----
Gga FAST -LVEEECYRPHVFLPPGYCTDFLLWLNRSRGTVLEPLSR-VPAASKAPPAAPPAISLRS---SVALALTS
Dre FAST -LVGEGHYKQDEVLPAGYYTDFLLWVDTGRVLPPIRTGTPAASLAASSTPCVVNLNLSKSPDGGSGVSTLTT
Hsa FASTKD1 LGG-INCVKASVLTPTYVHKVDFECILDKRKKPLPYGSHNIALGQLPEMPWESN-----
Mmu FASTKD1 LGG-HQCVKPSALSPYVHTVGFECILDKRKKPLPYESHISIAPRKSLSGMHWDS-----
Gga FASTKD1 LGG-SHYARVSVLTPTYEYIDFECILDKNKKPLSYTAQNILLDLRGRVHLRHD-----
Hsa FASTKD2 LGG-EGHFSKDVHLPNHYHIDFEIRMDTNRNOVLPLSD-----
Mmu FASTKD2 LGG-EGRFSRNVLPNHYHIDFEIRMDTNRTOVFSFSD-----
Gga FASTKD2 LGD-ENMFRONVQLPYEYRIDFEIWMDSDTKKVLPIFA-----
Dre FASTKD2 VGT-HAVQDSVLEQSIFFIDCVITLPGEKVETCGLH-----
Hsa FASTKD3 LGA-RLVFAPKVLTPYCYTIDVHIKLDDEEGFVLP-----
Mmu FASTKD3 LGS-RLVFASKVLTPTYTYTIDVEVKLDEDGFVLP-----
Gga FASTKD3 LKK-GMYFSSEVSTPYFYTVDIRIKLDEEGFMFLP-----
Dre FASTKD3 LGD-QSIVASRVLTPTYCYTLDIHIKLDDEDGFVLP-----
Hsa FASTKD4 LGS-ADKGSLEVATQYGWVLDARVLLDSDGEFLPVRDFVAPHLAQP-----
Mmu FASTKD4 LGN-TDRGSLEVATQYGWVLDARVLLDADGHFPLRNFVAPHLAQP-----
Gga FASTKD4 LGS-QDNGRWDVHTIYGWQIDAEVMLNSENKPLPKDFAAPHLPHSE-----
Dre FASTKD4 ANERKQALHTAVKTLYGWTIDGELVVDSENKPIDMENFKAPHLPEGG-----
Hsa FASTKD5 MLGGPQYVKKHMHILPHTRSSDLEVQLDVNLKPLPFNREATPAENVAK-----
Mmu FASTKD5 MLGGPQYIKHMHILPHTRSSDLEVQLDANMKPMPFNSEATPTEDGAG-----
Gga FASTKD5 MLGGPEYVKNHMHILPHTRSSDLEVHLAMDGHPIPFN---SSDTVAL-----
Dre FASTKD5 LGGEMFVRKMHILPHLRSIDLEVHLDQNDQPVSVTSGSCQRELASON-----

841

Hsa FAST ---QDPFLP-----YPPRSCQD-----
Mmu FAST ---QDPFLP-----YPPRSCQD-----
Gga FAST DLQDFAPFAP-----ETPGSPPAARRENLAG--RFLSTLCPAPGGPCYQPPSDYICALSKSS
Dre FAST DFQKFSPFATSLLEEADKRAGEESTFLPAHMRPAAASGSQVRVGNPTVPLEYNPYYSTSDYYSNLAKHS
Hsa FASTKD1 -----I-
Mmu FASTKD1 -----IK
Gga FASTKD1 -----IK
Hsa FASTKD2 -----
Mmu FASTKD2 -----
Gga FASTKD2 -----
Dre FASTKD2 -----
Hsa FASTKD3 -----
Mmu FASTKD3 -----
Gga FASTKD3 -----
Dre FASTKD3 -----
Hsa FASTKD4 -----
Mmu FASTKD4 -----
Gga FASTKD4 -----
Dre FASTKD4 -----
Hsa FASTKD5 --LRLEHVGVS-----LTDDLMLNKLKGG-----ARGH
Mmu FASTKD5 --LRFKQVGVV-----LTDDLMLNQLKGG-----AKRY
Gga FASTKD5 --KKLKDIGVS-----LTDDLMAQLKGG-----SNSQ
Dre FASTKD5 --WEQKPFGIT-----LTDDLQAQLTNTQ-----KTQL

911

```

Hsa FAST      -QAASSATTROP-----
Mmu FAST      -QANFNSTQDP-----
Gga FAST      LESQGSSTLSSPSECLSAQPAGTDCSPRGSSAATLFFPIGKILEEEAAACPSRERSCFQGEQPHEEAF
Dre FAST      LESQDSSSTLSSPSDCLTQTGSPVPGTVAPQD---SLFQFSIGKILEDEGGAATGANPGPDCEIATFYEGV

Hsa FASTKD1   EIVGSRLLPPGAE-----
Mmu FASTKD1   -RVEPRLPPEAE-----
Gga FASTKD1   DEERKALPOGAC-----

Hsa FASTKD2   --VDTTSATDIO-----
Mmu FASTKD2   --VDASSATNMQ-----
Gga FASTKD2   --TDSYADRSVQ-----
Dre FASTKD2   --EDCGSPECNQ-----

Hsa FASTKD3   ---STANEDIHK-----
Mmu FASTKD3   ---CTVDEDIHK-----
Gga FASTKD3   ---ATQCEEVHT-----
Dre FASTKD3   ---ACHADDVHK-----

Hsa FASTKD4   --GSQSPPPGSK-----
Mmu FASTKD4   --GNQPLPPGAK-----
Gga FASTKD4   --GTKPLPPGAR-----
Dre FASTKD4   --GADALPEGTR-----

Hsa FASTKD5   FQGKTESSEPGQQ-----PMELFNKAA--VPL
Mmu FASTKD5   FQGQIELETGQP-----PMELRKKTT--VPL
Gga FASTKD5   SPAEGTEAAAP-----ROEWNQAPTPSVSL
Dre FASTKD5   EPFNKFLQOPVP-----ORVEPVRESLLSVG
  
```

981

```

Hsa FAST      -----AQRVVLVLRERWHFCRDGRVLLGSRALRERHLGLMG
Mmu FAST      -----AQRVVLMLRERWHFCRDGRVLLGSRALRERHLGLMG
Gga FAST      GRSPAPAEADACPPSPSPCRPGPARGPTEGPPAADEIQRVVLVSVNDKWHYCONSILVGSRAMRDRHLRLLG
Dre FAST      SYPEGGESDGVTAASPLQLHNPDPNEADHRTTGEQVKRVIMSVNDKWHYCHNSVLVGSRAMRDRHLRLMG

Hsa FASTKD1   -----RIALEFLDSKALCRNIPHMKGKSAAMKRRHLEILG
Mmu FASTKD1   -----RIALELLDVRAFCSNIPHLKGSAMKRRHLEILG
Gga FASTKD1   -----RIALEFLDSKAFSKDSSHLLKGEPAVKRRHLEILG

Hsa FASTKD2   -----RVAVLCVRSAYCLGSSHPRGFLAMKMRHLNAMG
Mmu FASTKD2   -----RVAVLCVPKSVYCLNSCHPRGLMAMKIRHNLVMG
Gga FASTKD2   -----RLAFLFVPPSAFCLGTHPQGLKAMKRRHLSKLG
Dre FASTKD2   -----RIAVICAQPNSEFCFTTHPRASLVMKLRHLEKLG

Hsa FASTKD3   -----RIALCIDGPKRFCSNSKHLGKEATKORHLQLLG
Mmu FASTKD3   -----RVALCIDGPORFCLDSKHLGKEATKORHLRLLG
Gga FASTKD3   -----RIALCVDGQNRFCVNSHNLGEEATKORHLQLLG
Dre FASTKD3   -----RIAVCIDGSORFAANAKKLLGKEAMKORHLRILG

Hsa FASTKD4   -----RLAFLRWEFPNFNSRSKDLLGRFVLARRHIVAAG
Mmu FASTKD4   -----RIAFLRWEFPNFNSRSKDLLGRFVLARRHVLAAG
Gga FASTKD4   -----RVAFRLRWEFPNFNSRSKELLGRYAMARRHIQAAG
Dre FASTKD4   -----RIAFVAWDFSNFCLSKSKDLLGRFAMQKRHLQLAG

Hsa FASTKD5   GGFLCNVADKSGAMEMAGLCP-----AACMOTPRMKLAVQFTNRNQCYGSRLLGLHNMKRRQLARLG
Mmu FASTKD5   VNSGCNGTDRLC-DGMVGLCP-----LAHMOPPLVKLAIQFTNKNQCYGSRALLGLHNMKRRQLVQIG
Gga FASTKD5   LSGVIADTRLQVTTTPSGSCPGGSPSLVLPQQQGVRLAIQVSNRNHYCYLSKRLGLGLCLKRRQLRQLG
Dre FASTKD5   IDLTDLLTLLTNSSKHSPPH-----KDSRPSVKRLAVQVTRNRNHYCYRTRKQLLGLHALKRRHLLTAG
  
```

1051

```

Hsa FAST      YQLLPLPFEELESQRLPQLKSY-----LROKLOALGLRWGPEGG-----
Mmu FAST      YQLLPLPFEELESQRLPQLKSY-----LROKLOALGLRWGPEGG-----
Gga FAST      YCLVQPRCPRPKPG---TPRAL-----RYSRPCRSPR-----
Dre FAST      YNILQLPYLELEKLNGLIEEVKQY-----LHKLLLEVPL-----

Hsa FASTKD1   YRVIQIS--QFEWNSMALSTK-----DARMDYLRECFGEVKSC-----
Mmu FASTKD1   YRVIQIP--YFEWNSMAMSTK-----DARMDYLREHLFCEGK-----
Gga FASTKD1   YRVIQIP--HFEWNSMVLSTK-----PEQLDYLRKRLYET-----

Hsa FASTKD2   FHVILVNNWEMDKLEMEDAVT-----FLKTKIYSVEALPVAAVNVQS-----
Mmu FASTKD2   FHVILIHNVWELKKLMEDAVT-----FVRKKIYSDEVLPADT-----
Gga FASTKD2   YHVIVPLNKKFQELTNEGAIE-----FLKGGKIYSENVSPFSEVNLCD-----
Dre FASTKD2   YQPVLPVPINELNSKTEEEKIKMLR-----TLIFPAHESPEISQKISNNSQOKED--

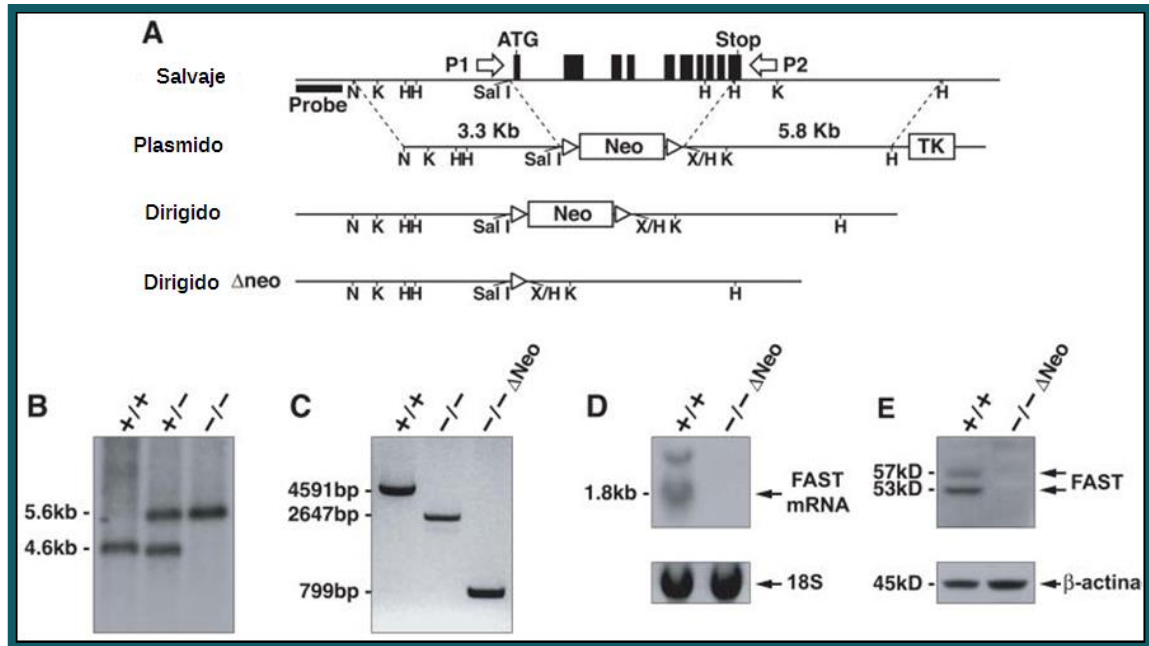
Hsa FASTKD3   YQVVQIPYHEIGMLKSREELV-----EYLQRKLFSONTVHW-----
Mmu FASTKD3   YQVVQLPYHELELLTSREELV-----DYLQRKLFSSQSSA-----
Gga FASTKD3   YKVVQVPFFVEVSIKSRKMA-----EYLHRKIFPHTYG-----
  
```

```

Dre FASTKD3 YEVVQIPYYEFKLLKKKEVV-----EYLHKKIFPHSYR-----
Hsa FASTKD4 FLIVDVPFYEWLELKSEWQKG----AYLKD KMRKAVAEELA-----
Mmu FASTKD4 FLVVDVPFYEWLELKSEWQKS----AYLKD KMRKAMAEELA-----
Gga FASTKD4 FLVVDVSRQPSAPGAARGPVLGLATVIPSGPPVROPOGREGD-----
Dre FASTKD4 FIVVEVPYFFELKSDWQKV-----AYLKD KLGKAVAEEMANASSPSASSPPKL
Hsa FASTKD5 YRVVELSYWEWLEPLLKRTRLEKL-----AFLHEKVFTSAL-----
Mmu FASTKD5 YRVVELPHWEWLEPLLKRTRLEKL-----AYLHEKVFTSAL-----
Gga FASTKD5 YVVVELPFWEWLEPLLKRTRLEKL-----SYLHYKVFNPVLLSRAG-----
Dre FASTKD5 YRVVELPHWEWLEPLLRRSQAEKL-----AYLHCKIFNYRD-----

```

Anexo A 4



Anexo A-4: Generación de ratones FAST KO.(A) Estrategia génica utilizada. La elección correcta eliminará FAST, reemplazándolo con un casete flanqueado por neo-loxP. El casete se elimina mediante cruces con ratones EIIa-Cre. Los exones están indicados en cajas negras. E, Ecl 136II; H, HindIII; K, KpnI; N, NotI; neo, casete con el gen de resistencia a neomicina; SI, SacI; X, XhoI; Δ , sitio loxP. (B) Análisis de transferencia de Southern blot de DNA genómico digerido con DraI proveniente de los ratones wild type (WT) (+/+), heterocigotos (+/-) y FAST KO^{-/-}. La sonda utilizada se muestra en A. (C) El análisis mediante PCR usando los primers P1 y P2 es capaz de distinguir los alelos WT, FAST^{-/-} neo⁺ (-/-), y FAST^{-/-} neo⁻ (-/- Δ neo). (D) Análisis de Northern de mRNA de fibroblastos de embriones de ratones (MEFs) WT y FAST^{-/-}. (E) Análisis de Western blot del extracto de proteínas de MEFs de WT y FAST^{-/-}. Figura adaptada de Simarro, 2010.