

**Universidad Autónoma de Madrid**

**Facultad de Ciencias**

**Dpto. de Biología Molecular**



**PAPEL DEL SUPRESOR TUMORAL p19ARF EN LA RESPUESTA  
INFLAMATORIA**

M<sup>a</sup> Raquel López Fontal

Madrid, 2010



# ***MEMORIA DE TESIS DOCTORAL***



## **PAPEL DEL SUPRESOR TUMORAL p19ARF EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA**

Presentada por  
M<sup>a</sup> Raquel López Fontal  
para aspirar al grado de doctor por la  
Universidad Autónoma de Madrid

Dirigida por:

Dra. Sonsoles Hortelano Blanco

Dr. Lisardo Boscá Gomar



Este trabajo ha sido realizado en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), bajo la dirección de la Dra. Sonsoles Hortelano Blanco y el Dr. Lisardo Boscá Gomar, con ayuda de una beca de Formación de Investigación del Instituto de Salud Carlos III y la ayuda predoctoral del CNIC.



Para Vicenta.  
Para mi familia.  
Para Ana y Jorge.





## Agradecimientos

Parece mentira que hayan pasado ya casi 6 años desde que en mi amada Compostela me animaran a echar la beca de introducción a la investigación del CSIC. El tiempo ha volado porque cada uno de los días en el laboratorio y en Madrid ha estado lleno de experiencias personales y profesionales incomparables. En estos años, creo que he crecido tanto como persona como lo he hecho como investigadora y parece que era otra la que decía... “pero sí no me van a dar la beca”. Y no solo tuve la suerte de que ese año alguien en el ministerio debió de equivocarse y me la concedieran, sino que me la dieron con el Dr. Lisardo Boscá. Y hasta Santiago llegaba su fama, y era tal, que me hizo coger un avión incluso un mes antes de que comenzase el periodo de la beca. Aterrizada en Tres Cantos, Lisardo me tendió una trampa, y me puso a trabajar con la Dra. Hortelano, y ya no tuve escapatoria, ¿quién se habría resistido?

Por supuesto debo empezar dando las gracias a la Dra. Sonsoles Hortelano y al Dr. Lisardo Boscá por aceptarme en su laboratorio, por concederme el privilegio de trabajar a sus órdenes y con ellos y por enseñarme tanto. También necesito agradecerles su generosidad por tratar de darme una formación predoctoral lo más completa posible, animándome a participar en congresos y estancias en el extranjero que tanto me han aportado.

A Sonsoles, por dónde empezar..., supongo que sencillamente ha sido (y será) un ejemplo para mí, tanto a nivel científico como personal. Que durante estos años ha sido una gran jefa, enseñándome y ayudándome en todo lo posible, confiando en mí y valorando mi opinión científica. Gracias a ella he sido la envidia de todos mis compañeros predoctorales de CNIC que tantas veces me han preguntado... “no puede ser tan buena como aparenta”...pues sí chicos, así es Sonso. Gracias por su paciencia en mis comienzos y por enseñarme tantas cosas en todos estos años, por no abandonar las pipetas y por ser consciente siempre de lo que pueden llegar a pesar.

A Lisardo le agradezco especialmente su manera de transmitir sosiego y optimismo al grupo y por valorar en su gente sobretodo, el esfuerzo y la ilusión por el trabajo junto al compañerismo y la actitud constructiva. Aunque CNIC casi rompe con parte de aquello, me alegra enormemente ser testigo de que no lo consiguió y que a pesar de todo, los “lisardos” hayamos conservado ese espíritu, el cual espero poder llevarme allí donde vaya. Y como no, también tengo que darle las gracias por haber compartido con nosotros tantos conocimientos científicos y humanistas que siempre nos dejaban boquiabiertos, nuestra “enciclopedia andante” con sus ideas brillantes.

Tengo que dar las gracias al Dr. Primitivo Barja y a la Dra. Ana Viñas por aceptarme en sus laboratorios cuando sabía de ciencia incluso menos que ahora y por

animarme a probar suerte en la investigación y por ser unos entusiastas de su trabajo, por motivar y valorar a sus alumnos y por ser un ejemplo para mí.

Quiero agradecer muy, muy especialmente a mis compañeros de laboratorio, por hacer el día a día mucho, muchísimo más fácil y alegre, porque ha sido un privilegio trabajar con ellos y tener su amistad, gracias por lo mucho que me habéis enseñado, siempre de forma altruista, por enseñarme de verdad lo que es la esencia de la ciencia. Si de algo me siento orgullosa después de estos años es de haberos podido ayudar en algo y de compartir tantas cosas con vosotros. A Dani, por todo lo que me ha enseñado de bioinformática y por tratar de sacar siempre lo mejor de todos, y porque CNIC quizás nunca sepa que gracias a él nacieron los “seminarios precarios” que nos enseñaron a estar orgullosos de esos *western* que no irán nunca en una publicación. Pero gracias sobretodo por su amistad y su integridad. A Paquí, madre mía! la mejor becaria senior que se puede tener, por enseñarme tantas cosas en el laboratorio, por su afán de superación, su sonrisa y por hacernos reír tantas veces, por concederme su amistad. A Miriam, por enseñarme tanto en mis comienzos, por regalarme su amistad a lo largo de estos años y por luchar siempre por lo que quiere contagiándome de su espíritu emprendedor. Gracias a Gemma, por su ayuda en el laboratorio, por sus trato humano con los animales, por su música, por su amistad. A Susana por su paciencia con una novatísima. A Mónica por su bondad y su literatura. A Rafa por compartir su experiencia conmigo y su compañerismo. A Alfonso, por ser un ejemplo del trabajo, sencillamente, bien hecho, sin pompa ni artificio, por su cabeza tan bien amueblada, por su amistad (aunque te haya tenido que suplicar tu número de tlf!), ha sido un verdadero privilegio poder trabajar y compartir este tiempo con él; y a Lele y a Nuria por unirse al grupo y seguir aportando tanto compañerismo al laboratorio, por su espíritu crítico y constructivo, a los tres gracias por su fuerza y no dejar que CNIC matase su entusiasmo. A Gabi por su enorme compañerismo, por su bondad, su amistad y su música, ha sido un placer trabajar con él. También quiero agradecer a la gente que le ha tocado aprender algo de este oficio conmigo, a Ana, a Denis, a María, a Marta, a Estela, sin duda yo aprendí mucho más de ellas. Al resto de la gente que ha formado parte del grupo LB, gracias por compartir su tiempo y experiencia conmigo.

Gracias a Paloma por su ayuda con los papeleos en Farmacia, por poder contar con ella para tantas otras cosas, por su franqueza y por sus contribuciones científicas al trabajo de todo el grupo. A Antonio C. por compartir sus conocimientos y su experiencia con tanto compañerismo, por su buen humor y carisma, por su honradez.

Tengo que agradecer a la gente de los grupos con los que nos ha tocado compartir laboratorio tras unas cuantas mudanzas (me encantaría poder nombrar a cada uno, pero necesitaría muchas páginas)..., a los “redondeles” en Tres Cantos, por enseñarme lo

que es el compañerismo y la complicidad entre científicos. A los “lamas” en la 2ª Norte, por comenzar con nosotros la aventura de Sinesio Delgado con toda la ilusión del mundo y por tener que compartir después también la desilusión de aquellos momentos tan duros en CNIC. A los compañeros de la 3ª Norte, especialmente a Tania, Tarín, Conchí, Mónica, Patri, Óscar, Enara, Enrique, Juancho, Raúl...por recordarme todos los días que lo verdaderamente importante es trabajar con alegría. Y a mis últimos compañeros en la 2ª Sur, a los “monsalves” por seguir demostrándome que el trabajo bien hecho no debería estar reñido con las sonrisas ni el compañerismo. Quiero agradecer muy especialmente a Sara, a Inma, a Talina, a Dolo, a Katia, a Mónica y a Sales por haberos convertido en las mejores compañeras y amigas, por vuestra fuerza y espíritu intrépido, por estar a las duras y a las maduras, sois un verdadero ejemplo para mí, gracias por todo lo que me habéis enseñado y por vuestra amistad y vitalidad.

Gracias también a la gente de los servicios y unidades del CNIC por su ayuda, su experiencia y su buen humor.

Gracias a toda la gente con la que he tenido el privilegio de poder colaborar, a la Dra. Marisa García, al grupo del Dr. Brindle, especialmente a André, al grupo del Dr. José C. Perales, al Dr. A. Rodríguez, al grupo del Dr. Kobayashi, especialmente a Kyoung-Hee, gracias por la amabilidad y el buen humor, por los conocimientos científicos y en muchos casos por dejarme formar parte, por un tiempo de su laboratorio.

No puedo dejar de agradecer a toda la gente que está fuera del “mundillo científico”, pero sin la cual esto no habría sido posible:

A Mar por recordarme a lo largo de todo este tiempo la importancia de la investigación en la vida real de la gente, por ser tan buena persona y sentir tanto, por su amistad y frescura.

A Ana, por su ejemplo, su amistad, su sensibilidad, por ser parte de mí y darme tanta fuerza para seguir adelante, gracias también por el inmenso privilegio de las correcciones de una profesional del lenguaje.

A Jorge, mi príncipe azul, por confiar tanto en mí y por quererme como lo hace y permitirme quererle como le quiero; por tener que soportar la “escritura” y hacerla tan dulce.

A mis padres y el resto de mi familia, por enseñarme de muchas maneras lo importante de la vida y estar ahí siempre. Quiero dedicar especialmente este trabajo a mi abuela Vicenta, “La Jefa”, por enseñarnos tanto, especialmente el valor del esfuerzo y por su implacable valentía ante todo lo venidero, por ser un ejemplo; al irse dejó un gran vacío que recordaré siempre.



*Índice*

---



---

<b>ABREVIATURAS</b> .....	9
<b>RESUMEN</b> .....	15
<b>SUMMARY</b> .....	19
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	23
1 <b>INFLAMACIÓN</b> .....	23
1.1    Los TLR ( <i>Toll-Like Receptor</i> ) y otros sensores de patógenos del sistema inmunitario innato. ....	25
1.1.1    Familia de receptores TLR.....	26
1.1.2    Vías de señalización mediadas por TLR.....	28
▪    Regulación negativa de las vías de señalización de los TLR.....	30
1.2    NFκB en la respuesta inflamatoria .....	30
1.3    Citoquinas, mediadores de la respuesta inflamatoria.....	32
1.4    Macrófagos en el proceso inflamatorio .....	33
1.5    Choque séptico y TLR4.....	36
2 <b>NUEVOS REGULADORES DE LA INMUNIDAD INNATA:         PAPEL DE LOS GENES SUPRESORES DE TUMORES</b> .....	38
2.1    El locus Ink4a/Arf y la proteína ARF.....	39
•    Locus Ink4a/Arf.....	39
•    La proteína ARF .....	40
2.2    Papel biológico de ARF.....	42
2.2.1    Funciones anti-proliferativas .....	42
▪    Supresor tumoral dependiente de p53.....	43
▪    Supresor tumoral independiente de p53.....	44
▪    Anti-proliferativo en el desarrollo.....	44
2.2.2    Función anti-viral.....	45
2.3    Mecanismos de acción de ARF .....	45
2.3.1    Actividad anti-ubiquitina-ligasa y secuestro en el nucleolo.....	45
2.3.2    Sumoilación .....	46
2.3.3    Control ribosomal .....	46
2.3.4    Actividad mitocondrial .....	48
2.3.5    Unión a múltiples proteínas celulares .....	48

<b>OBJETIVOS</b> .....	53
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	57
1 <b>MATERIALES</b> .....	57
1.1 Reactivos .....	57
1.2 Animales .....	58
2 <b>MÉTODOS</b> .....	60
2.1 Análisis de genotipo .....	60
2.2 Extracción de DNA de cola de ratón .....	62
2.3 Obtención de cultivos primarios.....	62
2.3.1 Aislamiento y cultivo de macrófagos peritoneales .....	62
2.3.2 Obtención y cultivo de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) .....	63
2.4 Cultivo de fibroblastos embrionarios murinos (MEFs).....	64
2.5 Medida de citoquinas en el medio de cultivo .....	64
2.6 Determinación de la síntesis de NO .....	64
2.7 Cuantificación de RNA y PCR cuantitativa en tiempo real.....	65
2.7.1 Aislamiento de RNA.....	65
2.7.2 RT-PCR .....	65
2.7.3 PCR cuantitativa o en tiempo real (Q-PCR) .....	66
2.7.4 <i>Microarray</i> de DNA .....	67
2.8 Preparación de extractos citosólico y nuclear.....	68
2.9 Preparación de extracto total. ....	68
2.10 Determinación de la concentración de proteínas .....	69
2.11 Análisis de proteínas por Western-Blot.....	69
2.11.1 Electroforesis y transferencia.....	69
2.11.2 Inmunodetección.....	69
2.12 Extracción y preparación de tejidos y tinciones histoquímicas .....	70
2.12.1 Inclusión de tejidos por congelación y sección en criostato .....	70
2.12.2 Inclusión de tejidos en parafina y sección en microtomo. ....	70
2.12.3 Tinción de cortes histológicos: Hematoxilina-Eosina (HE).....	71
2.13 Ensayo de unión al DNA del factor de transcripción NFκB (p65).....	71
2.14 Preparación de plásmidos. ....	72
2.14.1 Transformación de bacterias competentes. ....	72
2.14.2 Crecimiento de bacterias transformadas y purificación de plásmidos. ....	72



2.15	Transfección de macrófagos.....	73
2.16	Transfección de vectores en células HEK293T.....	73
2.17	Análisis por citometría de flujo de las poblaciones leucocitarias.....	74
2.18	Detección de marcadores de superficie mediante citometría de flujo. ....	74
2.19	Ensayos de adhesión.....	74
2.19.1	Adhesión estática.....	74
	• Adhesión celular a proteínas de matriz extracelular. ....	74
	• Co-adhesión celular macrófago-endotelio.....	75
2.19.2	En flujo.....	76
2.20	Análisis de sangre periférica.....	76
2.20.1	Recuento de poblaciones celulares sanguíneas.....	76
2.20.2	Extracción de plasma sanguíneo.....	76
	• Cuantificación de citoquinas en plasma.....	76
	• Análisis de actividades enzimáticas.....	77
2.21	Peritonitis inducida con tioglicolato.....	77
2.22	Edema en oreja de ratón y actividad mieloperoxidasa (MPO).....	77
2.22.1	Determinación de la actividad (MPO) en oreja.....	77
2.23	Choque endotóxico inducido por LPS.....	78
2.24	Análisis estadístico.....	78
<b>RESULTADOS.....</b>		<b>81</b>
1	LA AUSENCIA DE p19ARF PROVOCA LA DISMINUCIÓN DE LAS CITOQUINAS INFLAMATORIAS EN RESPUESTA LIGANDOS DE LOS TLR.....	81
1.1	Respuesta a TLR4.....	81
1.2	Respuesta a otros TLR.....	87
2	EL DÉFICIT DE p19ARF AFECTA A LA LIBERACIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS.....	89
3	LA AUSENCIA DE p19ARF DISMINUYE LA ACTIVACIÓN NFκB Y LAS MAPK EN MACRÓFAGOS ESTIMULADOS CON LPS. ....	91
4	LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS TLR EN LOS RATONES p19Arf <sup>-/-</sup> ESTÁ ALTERADA.....	93
4.1	Regulación de la expresión del locus Ink4a.....	93
4.2	Regulación de la expresión de los TLR.....	96
5	LA SOBRE-EXPRESIÓN DE p19ARF RESCATA EL FENOTIPO DE LAS CÉLULAS p19Arf <sup>-/-</sup> .....	99

6	LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA POR p19ARF NO ESTÁ MEDIADA POR p53.....	102
7	OTROS CANDIDATOS POSIBLES PARA REGULAR LA VÍA TLR-p19ARF.....	105
8	LA AUSENCIA DE p19ARF MODIFICA EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE SUPERFICIE IMPLICADAS EN LA DIFERENCIACIÓN, ACTIVACIÓN Y EXTRAVASACIÓN DE LEUCOCITOS. ....	106
9	LA AUSENCIA DE p19ARF MERMA LA CAPACIDAD DE ADHESIÓN DE LOS MACRÓFAGOS.....	111
9.1	Adhesión in vitro. ....	111
9.2	Adhesión en flujo. ....	113
10	LA AUSENCIA DE p19ARF ALTERA LA POLARIDAD M1-M2 DE LOS MACRÓFAGOS. ....	115
11	PAPEL DE p19ARF EN PROCESOS INFLAMATORIOS <i>IN VIVO</i> .....	118
11.1	p19ARF está involucrada en la infiltración de neutrófilos y monocitos en peritonitis.....	118
11.2	La inflamación dérmica inducida por TPA está reducida en los animales p19Arf -/-. ....	121
11.3	Los animales p19Arf-/- son resistentes al choque endotóxico inducido por LPS.....	123
	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>129</b>
	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>143</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>147</b>
	<b>ANEXO I: Artículos.....</b>	<b>173</b>

## *Abreviaturas*

---



<b>1400W</b>	N-(3-(Aminometil)benzil)acetamidina
<b>ARF</b>	Pauta alternativa de lectura ( <i>Alternative Reading Frame</i> )
<b>ATF3</b>	Factor activador de la transcripción 3 ( <i>Activating Transcription Factor-3</i> )
<b>ATM</b>	Ataxia telangiectasia mutada ( <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i> )
<b>BMDM</b>	Macrófagos derivados de médula ósea ( <i>Bone-Marrow-Derived Macrophages</i> )
<b>BrEt</b>	Bromuro de etidio
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CDC6</b>	Ciclo de división celular 6 ( <i>Cell Division Cycle 6</i> )
<b>CDKN2a</b>	Quinasa dependiente de ciclina N2 ( <i>Cyclin-Dependent Kinase N2</i> )
<b>CDKs</b>	Quinasas dependientes de ciclinas ( <i>Cyclin-Dependent Kinases</i> )
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario ( <i>complementary DesoxiriboNucleic Acid</i> )
<b>CFSE</b>	5-(y -6)-carboxifluoresceina diacetato succinimidil ester, isómeros mezclados
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa 2
<b>CpG-DNA</b>	Cisteina fosfo guanosina ácido desoxirribonucleico ( <i>Cystein-phospho-Guanosin DNA</i> )
<b>C<sub>t</sub></b>	Ciclo umbral de amplificación de secuencia de PCR ( <i>Cycle threshold</i> )
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico ( <i>DesoxiriboNucleic Acid</i> )
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótido fosfato ( <i>desoxiriboNucleotid-Phosphate</i> )
<b>dsRNA</b>	RNA de doble cadena ( <i>doble stranded RNA</i> )
<b>ECL</b>	Quimioluminiscencia potenciada ( <i>Enhanced Chemiluminescence</i> )
<b>EDTA</b>	Ácido etilen-diamino tetra-acético
<b>EGTA</b>	Ácido etilen-bis tetra-acético
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ( <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> )
<b>ERK</b>	Quinasa regulada por señales extracelulares ( <i>Extracellular signal-regulated kinase</i> )
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
<b>GM-CSF ó GMSF</b>	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
<b>HSP</b>	Proteína de choque térmico ( <i>Heat-shock protein</i> )
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IKKs</b>	Quinasas de IκB ( <i>IκB Kinases</i> )
<b>IL-10</b>	Interleuquina 10
<b>IL-1β</b>	Interleuquina 1 beta
<b>IL-6</b>	Interleuquina 6
<b>INK4a</b>	Inhibidor a de CDK4
<b>IRAKs</b>	Quinasas asociadas al receptor de IL-1 ( <i>IL-1 Receptor-Associated Kinases</i> )
<b>IRF3</b>	Factor 3 regulador de IFN ( <i>IFN-Regulatory Factor 3</i> )
<b>IκBα</b>	Inhibidor del factor nuclear factor kappa B subunidad alfa ( <i>Inhibitor of nuclear factor kappa B subunit alpha</i> )

## Abreviaturas

---

<b>JNK</b>	Quinasa del N-terminal de c-Jun ( <i>c-Jun N-terminal kinase</i> )
<b>LBP</b>	Proteína de unión a LPS ( <i>LPS-Binding Protein</i> )
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LTA</b>	Acido lipoteicoico
<b>MAPK</b>	Proteínas quinasas activadas por mitógenos ( <i>Mitogen-activated protein kinases</i> )
<b>M-CSF ó CSF-1</b>	Factor estimulador de colonias de macrófagos ( <i>Macrophage- Colony Stimulating Factor</i> )
<b>MDM2</b>	Doble minuto 2 de ratón ( <i>Mouse Double Minute 2</i> )
<b>MEF</b>	Fibroblastos embrionarios murinos
<b>MMP</b>	Metaloproteínasa de matriz ( <i>Matrix MetalloProteinase</i> )
<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero ( <i>messenger RiboNucleic Acid</i> )
<b>MyD88</b>	Proteína 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide ( <i>Myeloid Differentiation primary-response protein 88</i> )
<b>NEDA</b>	<i>N</i> -(1-naftil) etil- enodiamina
<b>NFκB</b>	Factor nuclear κB ( <i>Nuclear Factor κB</i> )
<b>NK</b>	célula natural asesina ( <i>Natural Killer</i> )
<b>NO</b>	Óxido nítrico ( <i>Nitric Oxide</i> )
<b>NOS-2</b>	Óxido nítrico sintasa 2 ó inducible ( <i>Nitric Oxide Synthase 2</i> )
<b>NPM ó B23</b>	Nucleofosmina ( <i>Nucleophosmin</i> )
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos ( <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> )
<b>pb</b>	pares de bases de nucleótidos
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PGRPs</b>	Proteínas de reconocimiento de péptido-glicano ( <i>Peptido-Glycan-Recognition Proteins</i> )
<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>PKR</b>	Proteína quinasa dependiente de RNA de doble cadena ( <i>double-stranded RNA-dependent protein kinase</i> )
<b>PMN</b>	Células polimorfonucleares ( <i>PolyMorphoNucleocytes</i> )
<b>poly(I:C)</b>	Ácido poli- Inosinico-poli-citidilico
<b>PRRs</b>	Receptores de reconocimiento de patrón ( <i>Pattern Recognition Receptors</i> )
<b>PSF</b>	Factor de <i>splicing</i> asociado a PTB ( <i>Polypyrimidine tract-binding protein-associated-splicing factor</i> )
<b>PSF</b>	<i>Polypyrimidine tract-binding protein-associated Splicing Factor</i>
<b>RB</b>	Retino-Blastoma
<b>RIP1</b>	Proteína 1 de interacción con receptor ( <i>Receptor-Interacting Protein 1</i> )
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico ( <i>RiboNucleic Acid</i> )

<b>RNS</b>	Especies reactivas de nitrógeno ( <i>Reactive Nitrogen Species</i> )
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>RP105</b>	Radioprotectora 105 ( <i>RadioProtective 105</i> )
<b>RT</b>	Retro-Transcripción
<b>SARM</b>	Proteína que contiene los motivos esteril $\alpha$ y armadillo ( <i>Sterile <math>\alpha</math> and Armadillo motif containing protein</i> )
<b>shRNA</b>	pequeño RNA en horquilla ( <i>small hairpin RNA</i> )
<b>siRNA</b>	pequeño RNA de interferencia ( <i>small interfering RNA</i> )
<b>SIRT</b>	Desacetilasa dependiente de NAD sirtuina-1 ( <i>NAD-dependent deacetylase sirtuin-1</i> )
<b>SOCS-1</b>	Supresor 1 de señalización de citoquina ( <i>Supresor of cytokine signalling-1</i> )
<b>TAK1</b>	Quinasa 1 activada por TGF- $\beta$ ( <i>TGF-<math>\beta</math>-Activated Kinase 1</i> )
<b>TAM</b>	Macrófagos asociados a tumores ( <i>Tumour-Associated Macrophages</i> )
<b>TBK1</b>	<i>TRAF-family-member-associated NF<math>\kappa</math>B activator (TANK)-Binding Kinase 1</i> (también conocida como NAK, <i>NF<math>\kappa</math>B-Activating Kinase</i> )
<b>TBX2</b>	Proteína 2 de caja-T ( <i>T-Box Protein 2</i> )
<b>TIRAP</b>	Proteína adaptadora que contiene dominio Tir ( <i>Tir-domain containing Adaptor Protein</i> )
<b>TLR</b>	Receptores semejantes a Toll ( <i>Toll-Like Receptors</i> )
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa ( <i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i> )
<b>TPA</b>	13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (también llamado PMA)
<b>TRAF6</b>	Factor 6 asociado al receptor de TNF ( <i>Tumor-necrosis-factor-Receptor-Associated Factor 6</i> )
<b>TRAIL</b>	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF ( <i>Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i> )
<b>Triad3A</b>	Proteína 3 que contiene el dominio Triad ( <i>Triad domain-containing protein 3</i> )
<b>TRIF</b>	Proteína Adaptadora con el domio TIR que induce IFN- $\beta$ ( <i>TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN-<math>\beta</math></i> )
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento vascular de endotelio ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
<b>WB</b>	Transferencia de proteínas ( <i>Western-Blot</i> )

**NOTA** Cuando nos refiramos a los genes utilizaremos minúsculas (ej. p19Arf) y cuando nos refiramos a las proteínas o mRNA utilizaremos mayúsculas (ej. p19ARF)





*Resumen*

---



Los *Toll-Like Receptors* (TLR) inician la respuesta inmunitaria innata disparando la activación de las vías inflamatorias que pueden potenciar la respuesta anti-tumoral. Recientemente se ha descrito que el supresor tumoral p19ARF (*Alternative Reading Frame*, en ratón) tiene una función antiviral, sin embargo se desconoce el papel preciso de p19ARF en la inmunidad innata. Con este trabajo mostramos que p19ARF desempeña un papel importante en la respuesta inmune dependiente de TLR. La inducción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias por el tratamiento con varios ligandos de TLR está notablemente disminuida en macrófagos peritoneales y macrófagos derivados de médula ósea de animales deficientes en p19Arf. Esta respuesta defectuosa a los ligandos de los TLR de las células p19Arf<sup>-/-</sup> implica alteraciones en eventos de la señalización intracelular tales como la activación de las MAPKs, la degradación de IκBα o la activación de NFκB. El análisis de la expresión de los receptores TLR muestra que los niveles de TLR4 y TLR2 son más bajos en las células p19Arf<sup>-/-</sup> que en las control (WT). La sobre-expresión de p19ARF rescata el fenotipo de las células deficientes para este gen, incrementando los niveles de TLR4 y la respuesta inflamatoria. Además, la expresión de TLR4 y TLR2 es más baja en hígado y corazón de los ratones p19ARF<sup>-/-</sup>. Por otro lado, los animales deficientes en p19Arf no pueden disparar eficientemente la respuesta inflamatoria en el modelo de peritonitis inducida por tioglicolato o el modelo de edema por TPA y además son más resistentes al choque séptico inducido por LPS. En conjunto, nuestros resultados indican que el supresor tumoral p19ARF es un regulador fundamental de la señalización celular inflamatoria.



*Summary*

---



Toll-like receptors (TLR) initiate innate immune responses leading to the activation of inflammatory pathways which may enhance host anti-tumour response. An antiviral action for the mouse tumour suppressor alternative reading frame (p19ARF) has been recently reported, however the precise role of p19ARF in innate immunity is unknown. Here we show that p19ARF plays an important role in TLR-dependent immune responses. In macrophages and bone marrow-derived macrophages from p19Arf-deficient animals, the induction of proinflammatory cytokines and chemokines by various TLR-ligands is severely impaired. The impaired response of p19Arf<sup>-/-</sup> cells to TLR ligands involves alterations in intracellular signalling events such as activation of MAPKs, I $\kappa$ B $\alpha$  degradation or NF $\kappa$ B activation. Analysis of expression of TLR receptors shows that TLR4 and TLR2 expression was lower in p19Arf<sup>-/-</sup> cells than in wild-type cells. Over-expression of p19ARF rescues the p19Arf-deficient phenotype, increasing TLR4 levels and inflammatory response. Furthermore, TLR4 and TLR2 expression was lower in liver and heart tissues from p19Arf<sup>-/-</sup> mice. In addition, animals lacking Arf cannot elicit an efficient inflammatory response in thyoglycollate-induced peritonitis or in TPA-oedema and are resistant to LPS-induced septic shock. Collectively, our results indicate that tumour suppressor p19ARF is a key regulator of inflammatory cell signalling.





## *Introducción*



## 1 INFLAMACIÓN

La palabra inflamación viene del latín *inflammatio*, que significa encender, hacer fuego. Se trata de un proceso fisiopatológico conocido desde la antigüedad, ya que las primeras referencias a la manifestación clínica de la inflamación fueron realizadas por los egipcios hace más de 5000. En el siglo V a.C. el gran médico griego, Hipócrates, describió los signos de la inflamación, aunque no sería hasta el siglo I d.C., cuando el médico romano Celsus describa estrictamente por primera vez los “4 puntos cardinales de la inflamación: calor, rubor, tumor (o hinchazón) y dolor”. Posteriormente en el siglo II d.C., Galeno escribió en sus tratados médicos acerca de la *functio laesa* (función alterada), pero habría que esperar hasta 1858 para que el prusiano R. Virchow reflejase este signo clínico como la quinta característica propia de la respuesta inflamatoria (Majno 1975)(Ilustración I).



**Ilustración I. Signos característicos de la inflamación.** Conocidos hace más de 2000 años. (Adaptada de Lawrence *et al.* 2002).

Estos signos clínicos, no son más que el reflejo de los fenómenos fisiológicos, celulares y humorales que se desencadenan en cualquier tejido de los vertebrados en respuesta a un daño que bien puede ser un traumatismo físico, radiaciones, una infección por patógenos, isquemia, agresión por tóxicos o un daño autoinmune. Todos ellos provocan una agresión

sobre las células del huésped que pone en marcha la cascada de eventos que constituyen la respuesta inflamatoria.

Así, tiene lugar la producción y liberación, a nivel local, de una compleja diversidad de moléculas activas: mediadores de inflamación, citoquinas, radicales de oxígeno y de nitrógeno, proteasas, etc., y a nivel sistémico, grandes incrementos en la síntesis de las llamadas proteínas de fase aguda, producidas por el hígado. Esto conlleva una vasodilatación (aumento del diámetro de vasos sanguíneos locales) y subsiguiente incremento del flujo sanguíneo en el área inflamada, determinando una hiperemia que se manifiesta como enrojecimiento o rubor y calor. Se produce también un aumento en la adhesión de los leucocitos a las paredes de los vasos sanguíneos locales y un incremento de la permeabilidad de los capilares que favorece el influjo de leucocitos (principalmente neutrófilos y monocitos) al tejido circundante y facilita la salida de macromoléculas plasmáticas y consecuentemente, por razones de equilibrio osmótico, la extravasación de plasma, que causa edema o hinchazón (o tumor) y que se debe a la acción directa de las quininas (bradiquinina, C2-quinina) o a la acción indirecta de las anafilotoxinas (C4a, C3a, G5a) mediada por la liberación de histamina y leucotrienos. El dolor resulta no solo de esa hinchazón, sino también de la estimulación de los receptores del dolor por péptidos como la bradiquinina.

En estas condiciones, la función alterada del tejido o pérdida de la homeostasis es inevitable debido a todos estos cambios fisiológicos junto con la acción hidrolítica, proteolítica y oxidante, además de fagocítica, de los macrófagos que alcanzan la zona inflamada. Finalmente, en condiciones normales, el estímulo causante de la inflamación es eliminado y los neutrófilos sufren apoptosis siendo fagocitados por los macrófagos. Estos macrófagos inflamatorios son reprogramados volviendo muchos de ellos (junto con los linfocitos que hubiesen migrado) al sistema linfático, o bien dejando de liberar señales inflamatorias para producir otras anti-inflamatorias que favorecerán la regeneración de la estructura y función del tejido. Esta última fase es la que se conoce como “resolución de la inflamación” y quizás sea la que todavía plantea más incógnitas a la comunidad científica (Serhan *et al.* 2005).

A pesar de ser una manifestación clínica conocida desde la antigüedad, la inflamación no fue entendida como una respuesta beneficiosa del cuerpo hasta 1794 cuando el cirujano escocés John Hunter escribió que: “La inflamación no debería ser considerada una enfermedad, sino, una respuesta que produce un efecto saludable tras algún daño o enfermedad”. Hoy en día no cabe duda de que la finalidad de la inflamación es eliminar el

agente dañino y regenerar el tejido afectado. Sin embargo, fenómenos prologados de inflamación pueden contribuir a la patogénesis no solo de numerosas infecciones sino de muchísimas enfermedades *a priori* no necesariamente infecciosas como son distintos tipos de cáncer, artritis reumatoide, asma, bronquitis, enfisema, glomérulo-nefritis, aterosclerosis, daño por isquemia-reperusión (infarto por oclusión y embolismo e infarto de miocardio), esclerosis múltiple, cirrosis hepática y un largo etc. (Nathan 2002).

### **1.1 Los TLR (*Toll-Like Receptors*) y otros sensores de patógenos del sistema inmunitario innato.**

La defensa del individuo frente a posibles patógenos se basa en la existencia de mecanismos específicos de la respuesta inmunitaria que constituyen las denominadas respuesta innata y respuesta adaptativa. En un individuo sano, la inmunidad innata es la principal vía de eliminación de aquellos microorganismos que superan la barrera de los epitelios, poniendo en marcha una reacción inflamatoria como primera respuesta defensiva que puede oponer el sistema inmunitario.

El sistema inmunitario innato está filogenéticamente muy conservado y está presente en la mayoría de los organismos pluricelulares (Hoffmann *et al.* 1999). Este sistema biológico tan antiguo evolutivamente, se caracteriza por la fagocitosis, el ataque con radicales de oxígeno, la activación de las proteínas del complemento y por la activación de receptores de membrana y citoplasmáticos. Estos receptores o PRR (*Pattern Recognition Receptors*) son capaces de disparar una respuesta celular muy compleja al contactar con una pléyade de distintas moléculas o ligandos procedentes de patógenos [PAMP (*Pathogen-Associated Molecules Pattern*)], bacterianos, víricos, fúngicos, de protozoos e incluso moléculas del propio organismo. Con esta batería de receptores de alta afinidad, los organismos superiores son capaces de detectar rápidamente mínimas cantidades de patógenos invadiendo sus tejidos, de modo que todo el sistema inmunitario tiene una buena oportunidad para atajar la infección antes de que sea demasiado tarde. Sin embargo, como muchos otros procesos biológicos, puede ser un arma de doble filo, ya que una respuesta inmunitaria desmesurada puede llevar a un final fatal.

Una creciente lista de moléculas de membrana y citoplasmáticas son capaces de reaccionar ante la presencia de distintas moléculas procedentes de múltiples tipos de patógenos, aunque actualmente se considera que los TLR (*Toll-Like Receptors*) son PRR

fundamentales en la respuesta inflamatoria y sin duda los mejor caracterizados, por lo que los describiremos en detalle más adelante. Otros receptores importantes, en este caso intracelulares son los de la familia NLR (NB-LRR- Related) o NOD (*Nucleotide binding Oligomerization Domain*) descritos por primera vez a comienzos del siglo XXI (Inohara *et al.* 2002; Akira *et al.* 2006; Ting *et al.* 2008). Los NLR reconocen derivados de peptidoglicanos como los dipéptidos ácido glutamil-diaminopimérico y el muramil dipéptido y otras estructuras bacterianas como la flagelina RNA bacteriano y vírico o tóxicos como asbestos y sílice, además de ligandos endógenos del propio hospedador. Por otro lado, los RLRs (Rig-I-Like Receptors) son sensores citoplásmáticos que reconocen ácidos nucleicos víricos y cuya existencia se ha conocido recientemente (Kumar *et al.* 2009a).

### 1.1.1 Familia de receptores TLR

A finales del siglo XX, se identificó la proteína Toll de *Drosophila* como el receptor esencial en los mecanismos de defensa contra infecciones por hongos (Lemaitre *et al.* 1996). Posteriormente se caracterizó en mamíferos un homólogo muy similar a la proteína transmembrana Toll de *Drosophila*, se trataba del Toll-Like Receptor 4 (TLR4) (Medzhitov *et al.* 1997). Hasta el momento, se han descrito 13 homólogos en mamíferos de la familia de los TLR, 12 de ellos expresados en ratones y 10 en humanos (Kumar *et al.* 2009a) (Tabla I). Se trata de glucoproteínas integrales de membrana tipo I con una estructura trimodular. El dominio extracelular o vesicular, N-terminal, contiene entre 16 y 28 residuos de leucina (LRR), mientras que el dominio C-terminal intracelular se conoce como el dominio *Toll/IL-1 receptor* (TIR) por su homología con el receptor de IL-1. El amplio espectro de receptores TLR es capaz de reconocer moléculas virtualmente de cualquier organismo patógeno: bacterias, virus, hongos y parásitos (Tabla I).

TLR	Ligandos	Co-receptores	Proteínas Adaptadoras	Localización
TLR1	Factores solubles bacterianos y Triacil-Lipoproteínas.	CD14, CD36 y Dectina1	MyD88, Tirap	Ubicuo
TLR2	Bacterianos: LTA, PGN, porinas, LPS. Fúngicos: Zymosán Víricos: proteínas NS3 y core de HCV, CMV, HSV-1 y virus del sarampión. Parasíticos: fosfolípidos de treponema y tripanosoma. Endógenos: HSP70, HSP60, defensinas y Cys3pam	CD14 y Dectina1	MyD88, Tirap	Membrana citoplásmica y fagolisosomas de células mieloides, mastocitos y células NK y en linfocitos T. Heterodimeriza con TLR1 o TLR6.
TLR3	Vírico/Helmítico: dsRNA Endógeno: mRNA Sintético: poly(I:C), siRNA; shRNA		TRIF	Endosomas en células mieloides y NKs
TLR4	Bacteriano: LPS Vírico: proteína F de RSV, VSV, MMTV, proteína de la envuelta Parasítico: Lípidos de <i>T. cruzi</i> Endógenos: HSP70, HSP90, fibronectina, heparina, ácido hialurónico, fibrinógeno, $\beta$ -defensina 2. Sintético: taxol (murino), MPL (mimético de LPS)	CD14, MD-2	MyD88, Tirap TRIF, TRAM	Membrana citoplásmica de monocitos/macrófagos, mastocitos y neutrófilos. Membrana del Golgi en células epiteliales. Células T reguladoras y células endoteliales.
TLR5	Bacteriano: Flagelina		MyD88	Membrana citoplásmica de células epiteliales, NK y células mieloides.
TLR6	Bacteriano: Diacil Lipopéptido (micoplasma)	CD14, CD36, Dectina1	MyD88, Tirap	Membrana citoplásmica de células mieloides, mastocitos y linfocitos B.
TLR7	Vírico: ssRNA		MyD88	Endosomas en linfocitos B, eosinófilos y células dendríticas.
TLR8	Vírico: ssRNA		MyD88	Endosomas de NK, linfocitos T y células mieloides
TLR9	Bacteriano: DNA Vírico: DNA Parasítico: Esporocitos malaria Sintético: CpG Endógeno: Cromatina		MyD88	Endosomas de células dendríticas, células B y NK.
TLR10	Desconocido		MyD88	Células B y dendríticas (humanos).
TLR11	Parasítico: profilina		MyD88	Superficie celular del epitelio urogenital murino. Dimeriza con TLR5
TLR12	Desconocido			(Murino)
TLR13	Desconocido			(Murino)

**Tabla I. TLR de mamíferos.** Se muestran los ligandos o PAMPs reconocidos por cada receptor TLR, co-receptores de membrana que participan en este reconocimiento, proteínas intracelulares que median en la señalización y ubicación de cada TLR (Adaptado de Akira *et al.* 2004; Hopkins *et al.* 2005; Beutler, B. A. 2009).

### 1.1.2 Vías de señalización mediadas por TLR.

Una vez que el ligando (PAMP específico) contacta con los TLR se produce la dimerización de los receptores que pueden formar homodímeros (como los TLR4) o heterodímeros (TLR2/TLR1 o TLR2/TLR6) sufriendo cambios conformacionales que permitirán la interacción con moléculas adaptadoras intracelulares. Estas proteínas adaptadoras contienen dominios *Toll/interleukin-1 receptors* (TIR) y son: MyD88 (*Myeloid differentiation primary-response protein 88*), TIRAP (*TIR-domain containing Adaptor Protein*), TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$* ) y TRAM (*TRIF-Related Adaptor Molecule*). Estas proteínas determinan la especificidad de las vías de señalización mediadas por los TLR. Clásicamente se distinguen dos grandes vías de señalización a partir de los TLR: la vía clásica o “MyD88 dependiente” (tras activación de TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9 o TLR10) y la vía “MyD88 independiente” (tras activación de TLR3 y TLR4) que va vía TRIF (Ilustración II).

#### Vía clásica o MyD88 Dependiente:

Todos los TLR conocidos hasta ahora, excepto TLR3, reclutan MyD88 a través del dominio TIR (Medzhitov *et al.* 1998). Una vez activada MyD88 se une a proteínas de la familia IRAK (*IL-1 Receptor-Associated Kinases*) que son capaces de activarse por fosforilación y unir TRAF6 (*Tumor-necrosis-factor-Receptor-Associated Factor 6*). El complejo IRAK1-TRAF6 se libera del receptor e interacciona con la quinasa de membrana TAK1 (*TGF- $\beta$ -Activated Kinase 1*) favoreciendo su activación. TAK1 será la encargada de activar por un lado, al complejo IKK (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  e IKK $\gamma$ ) que permitirá que los inhibidores I $\kappa$ B sean degradados por el proteasoma. Así el heterodímero NF $\kappa$ B (*Nuclear Factor  $\kappa$ B*) p50/p65 quedará libre para migrar al núcleo donde activará la transcripción de citoquinas y enzimas inflamatorias. Por otro lado, TAK1 fosforila y activa a las MAPK que a su vez permitirán que AP-1 colabore igualmente en la transcripción de las citoquinas y enzimas inflamatorias (Akira *et al.* 2004; Kumar *et al.* 2009b). Datos recientes (Takaoka *et al.* 2005; Lee, M. S. *et al.* 2007) señalan que TRAF6 es capaz de activar a IRF5 en respuesta a ligandos de los TLR de forma MyD88-dependiente y que IRF5 (*Interferon Regulatory Factor 5*) participa también en la transcripción de citoquinas proinflamatorias junto con p65/p50 y las MAPK.

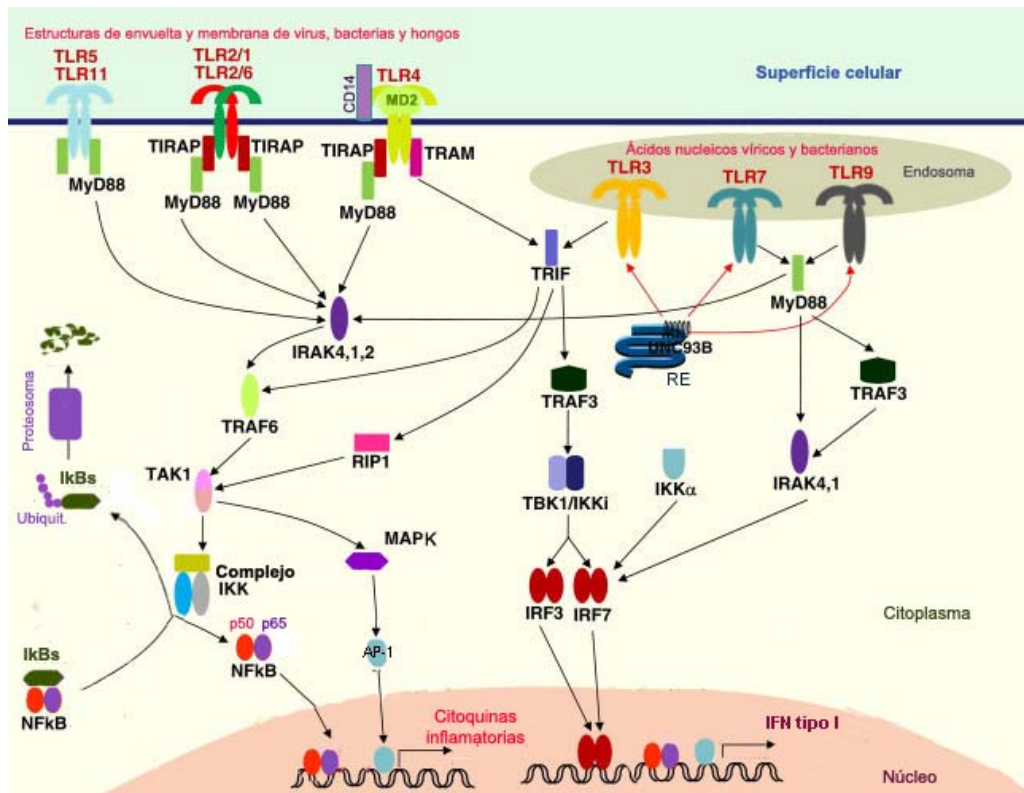


Vía MyD88 Independiente

TLR3 y TLR4 son capaces de iniciar una vía dependiente de TRIF (o TICAM1), e independiente de MyD88, que termina con expresión de interferones tipo I además de citoquinas pro-inflamatorias (Kawai *et al.* 1999; Hoebe *et al.* 2003a; Hoebe *et al.* 2003b. Esta vía es capaz de activar a IRF3, NFκB y MAPK (Kawai *et al.* 2001; Yamamoto *et al.* 2003).

La activación de IRF3 (*IFN-Regulatory Factor 3*) se produce al ser fosforilado por TBK1 (*TRAF-family-member-associated NFκB activator (TANK)-Binding Kinase 1*) e IKKε (IKK inducible o NEMO), lo que favorece la dimerización de IRF3 y su translocación al núcleo para activar la transcripción de los genes de IFN tipo I (IFNβ e IFNα).

Esta vía a través de TRIF también es capaz de activar NFκB mediante dos mecanismos independientes: TRIF interactúa con TRAF6 que a su vez es capaz de activar a TAK1 y la subsiguiente cascada de activación de NFκB. Por otro lado, TRIF puede activar a RIP1 (*Receptor-Interacting Protein 1*) que también es capaz de activar a la quinasa MAPKKK, TAK1 (Akira *et al.* 2004; Kumar *et al.* 2009b).



**Ilustración II. Modelo de señalización por TLR en un macrófago convencional.** (Adaptado de Kawai *et al.* 2006; Kumar *et al.* 2009b; Kumar *et al.* 2009a).

### ▪ Regulación negativa de las vías de señalización de los TLR.

Dada la importancia de las vías de señalización que se ponen en marcha como consecuencia de la activación del sistema inmunitario es imprescindible la existencia de mecanismos de control que permitan establecer un equilibrio constante entre su activación y su inhibición. Así se logrará una respuesta inflamatoria adecuada en cada situación, y se limitará en todo lo posible los efectos perjudiciales de la inflamación. Es por ello, que la señalización a través de los TLR está finamente regulada al contar con mecanismos que reprimen estas vías de señalización. En macrófagos y monocitos destacan los siguientes mecanismos (Liew *et al.* 2005; Wang *et al.* 2009): la inhibición de la unión de los TLR a sus ligandos a través de los TLR solubles (receptores *decoy*) o de supresores de la unión de los TLR a moléculas de membrana (ST2, SIGIRR, TRAILR y RP105), la inhibición de las señales intracelulares por moléculas citosólicas como MyD88s, IRAKM, SOCS1, NOD2, PI3K, SARM, TOLLIP y A20, la disminución de la transcripción o traducción de los TLR, así como el aumento de la degradación de los mismos (a través de mecanismos que incluyen ubiquitinación y degradación), junto con la actividad anti-inflamatoria de citoquinas como TGF- $\beta$  e IL-10, y por último la eliminación por apoptosis de las células hiperactivadas.

## 1.2 NF $\kappa$ B en la respuesta inflamatoria

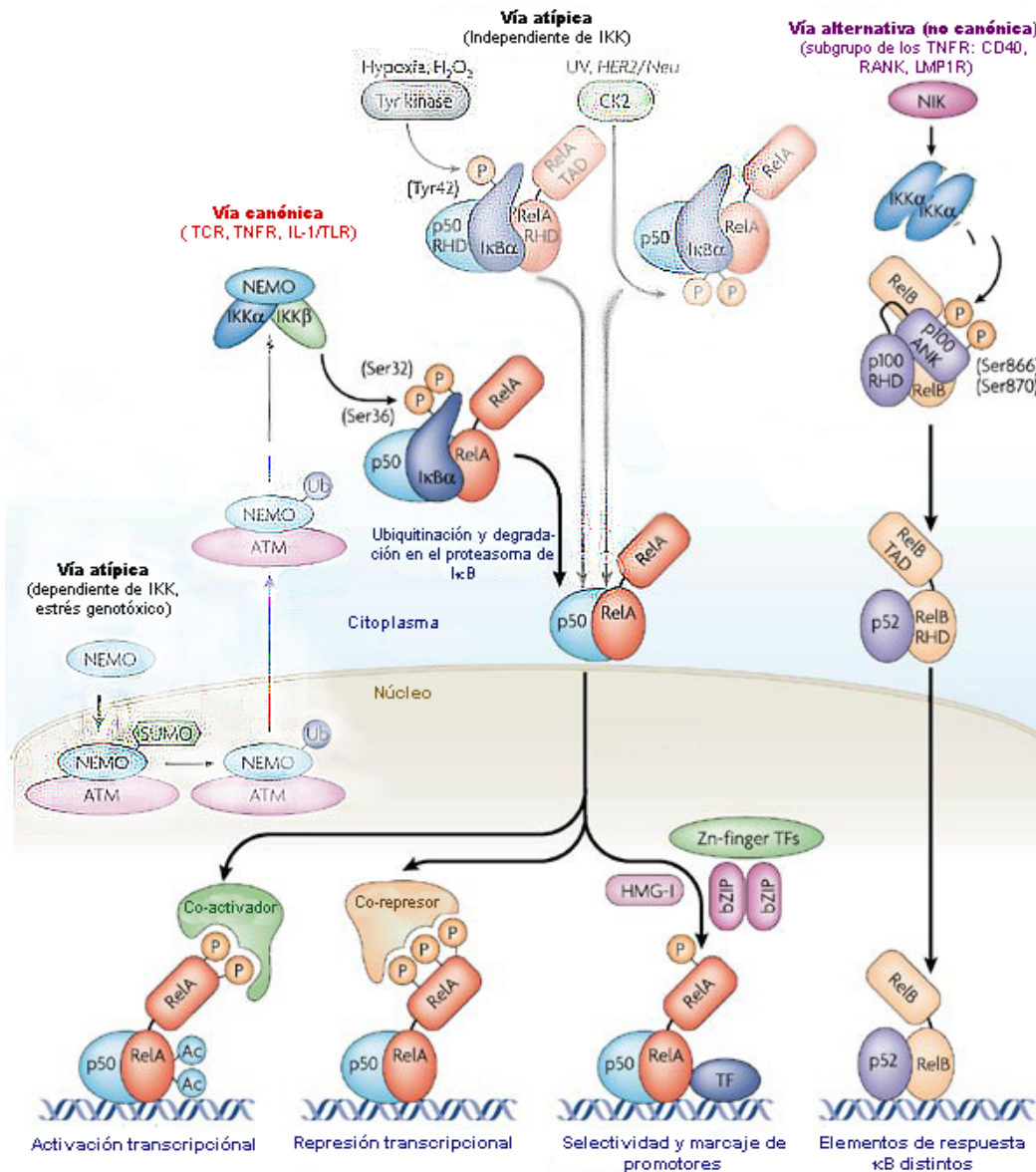
Tal y como hemos mencionado anteriormente, el factor de transcripción nuclear NF $\kappa$ B desempeña un papel clave en las vías de señalización reguladas por los TLR.

La familia de los factores de transcripción Rel/NF $\kappa$ B de mamíferos engloba a 5 miembros: RelA (p65), c-Rel, Rel-B, NF $\kappa$ B1 (p50 y su precursor p105) y NF $\kappa$ B2 (p52 y su precursor p100) (Vallabhapurapu *et al.* 2009). Estas proteínas forman homo- o heterodímeros y regulan la expresión de distintos genes relacionados en inmunidad adaptativa e innata, inflamación, anti-apoptosis, proliferación y respuesta a estrés y progresión tumoral.

En condiciones basales, NF $\kappa$ B se encuentra inactivo y secuestrado en el citoplasma por una familia de proteínas inhibidoras conocidas como I $\kappa$ B. Esta familia se caracteriza por la presencia de motivos de ankirina y está formada por 7 miembros: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$ ,

I $\kappa$ B $\zeta$ , I $\kappa$ BNS y Bcl-3. Las tres primeras, I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\epsilon$  son las proteínas clásicas que se localizan en el citoplasma unidas a distintas unidades de NF $\kappa$ B. I $\kappa$ B $\gamma$  se transcribe de la región C-terminal de p105 y aparece también predominantemente en el citoplasma junto a p100 que también actúa como inhibidor de NF $\kappa$ B (Carmody *et al.* 2007). El resto de miembros de la familia I $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\zeta$ , I $\kappa$ BNS y Bcl-3, se localizan fundamentalmente en el núcleo y no se degradan tras ser fosforiladas, como sí ocurre con las cuatro primeras.

Hay varias vías de activación de NF $\kappa$ B (Ilustración III). La mejor conocida es la canónica o clásica que se induce por estímulos inflamatorios como el LPS, citoquinas como el TNF $\alpha$  e IL-1 y también por activación del receptor de células T (Perkins 2007). Esta ruta se caracteriza por la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  en las Ser32 y Ser36 por el complejo IKK (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , unidades catalíticas e IKK $\gamma$ , reguladora) y su subsecuente ubiquitinación y degradación por el proteasoma. Esto permite la translocación de p65/p50 al núcleo dónde participa en la activación o represión de la transcripción de distintos genes colaborando con co-activadores, co-represores y otros factores de transcripción. De hecho muchas citoquinas y otros mediadores pro-inflamatorios presentan sitios de unión para NF $\kappa$ B en sus promotores (Collart *et al.* 1990; Xie *et al.* 1994).



**Ilustración III Vías de activación de NFκB.** Se muestra la vía canónica que se dispara cuando los TLR contactan con sus ligandos. (Adaptado de Perkins 2007).

### 1.3 Citoquinas, mediadores de la respuesta inflamatoria.

Entre los principales mediadores solubles que regulan la respuesta inflamatoria destacan las citoquinas. Estas son proteínas de pequeño peso molecular secretadas por las células del sistema inmune innato y adaptativo y por células endoteliales.

Suelen clasificarse en tres grandes grupos en función de sus efectos biológicos: citoquinas mediadoras y reguladoras de la inmunidad innata, mediadoras y reguladoras de la inmunidad adaptativa y estimuladoras de la hematopoyesis.

Todas ellas presentan características comunes:

- Su liberación es un proceso transitorio y muy regulado en el tiempo. Una vez sintetizadas se secretan inmediatamente (no se almacenan).
- Su acción es pleiotrópica y redundante.
- La mayoría actúan a nivel local, autocrina o paracrinamente. No obstante, algunas pueden tener acción endocrina.
- Actúan al unirse a receptores de membrana presentes en las células diana.
- Suelen afectar a la expresión génica en sus células dianas. Incluso, una citoquina puede inducir la producción de otras.

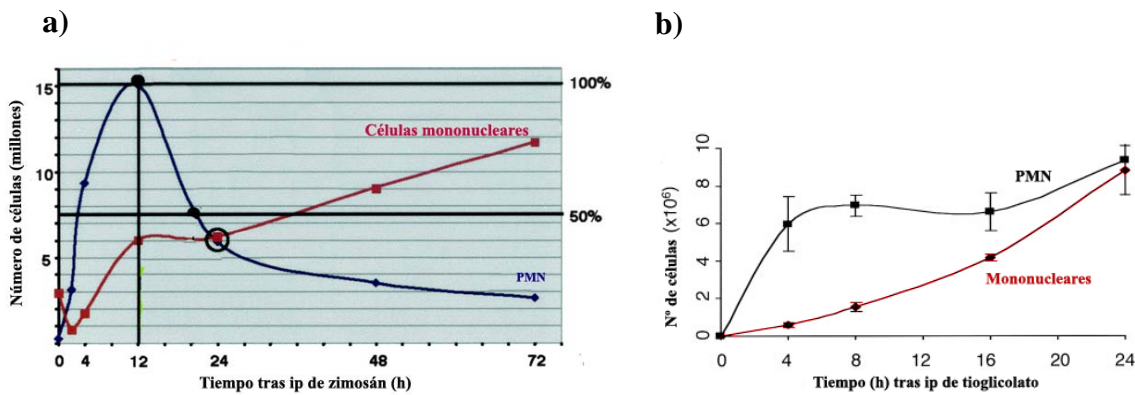
Las citoquinas pro-inflamatorias más importantes son  $\text{TNF}\alpha$ , las interleuquinas, IL-1 e IL-6 (llamadas así por que sus principales productores son leucocitos) y los interferones tipo I,  $\alpha$  y  $\beta$ , y el tipo II, IFN  $\gamma$ . Las citoquinas son producidas fundamentalmente por macrófagos y células cebadas y presentan diferentes funciones que incluyen activación del endotelio y los leucocitos y potenciación de la capacidad bactericida de los fagocitos durante la fase aguda de la inflamación (Medzhitov 2008).

Un grupo importante de citoquinas son las quimioquinas, liberadas principalmente por células endoteliales, linfocitos T, fibroblastos y monocitos, su función principal es la atracción de granulocitos, monocitos y linfocitos hasta los tejidos inflamados (Imhof *et al.* 2004).

### **1.4 Macrófagos en el proceso inflamatorio**

Como hemos visto, una de las principales células implicadas en el proceso inflamatorio es el macrófago. El macrófago, nombre con el que se conoce al monocito extravasado de la circulación sanguínea, es una célula altamente especializada, procedente de la proliferación de un precursor mieloide originado en la médula ósea. Monocitos circulantes y macrófagos constituyen las células del sistema fagocítico mononuclear cuya principal función es la fagocitosis y muestran una marcada heterogeneidad fenotípica

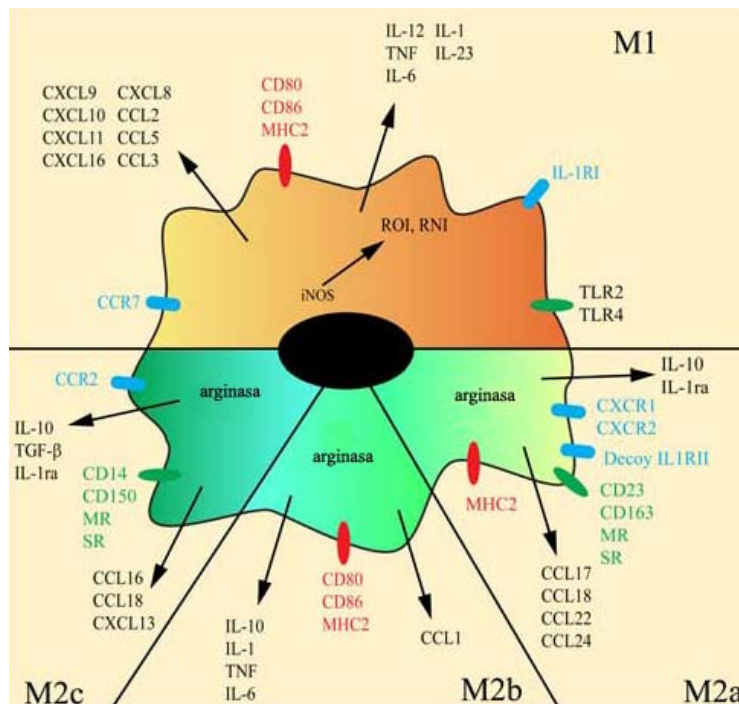
dependiendo del grado de diferenciación, distribución tisular y respuesta a estímulos endógenos y exógenos.



**Figura I Modelos de clásicos de inducción de peritonitis a)** Cinética de infiltración peritoneal de leucocitos tras inyección intraperitoneal con zimosán (componente de la pared de levaduras que se une a TLR2) (Adaptado de Bannenberg *et al.* 2005). **b)** Cinética de infiltración peritoneal hasta las 24h tras inyección intraperitoneal del agente irritante tioglicolato (Adaptado de Henderson *et al.* 2003). PMN, células polimorfonucleares.

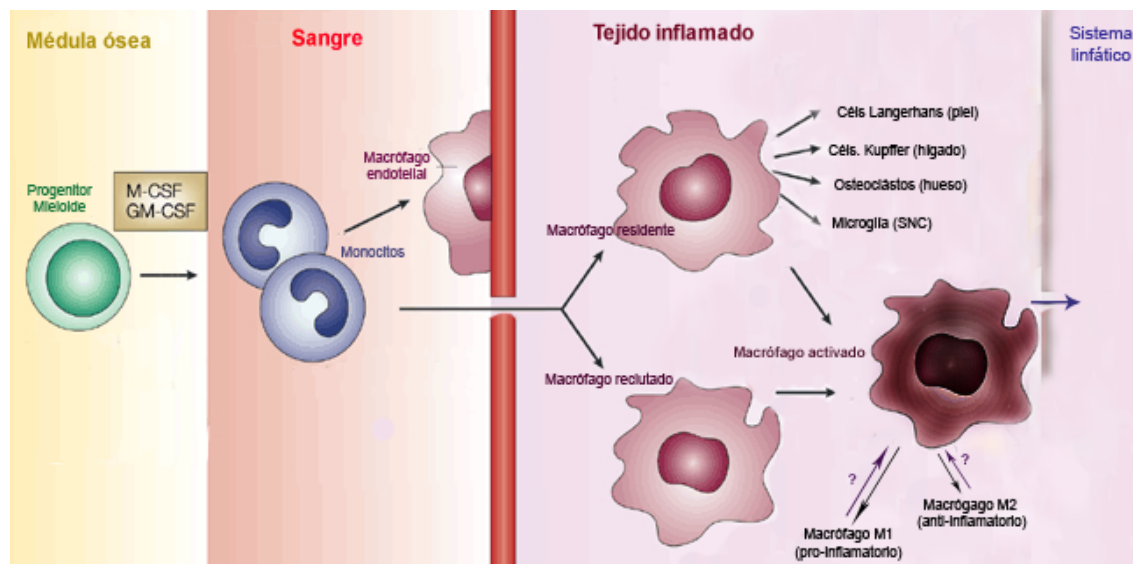
Inicialmente, en el proceso de inflamación aguda se produce la activación de los macrófagos residentes (centinelas del sistema inmune, que son los primeros en detectar una invasión por patógenos) y la extravasación de los monocitos sanguíneos, junto con otros leucocitos de sangre periférica, al tejido afectado atraídos por las quimioquinas y moléculas de superficie producidas por el endotelio activado de la zona afectada (Springer 1994; Ley *et al.* 2007). Esta extravasación sigue una cinética bien caracterizada, produciéndose un aumento considerable de leucocitos a partir de las 4h tras el estímulo inflamatorio, con un máximo de infiltración de polimorfonucleares (granulocitos) a las 12h y acumulación posterior de monocitos y macrófagos a partir de las 12h-24h (Figura I a y Figura I b). Una vez en el tejido, los macrófagos residentes y extravasados son activados por los PAMP y citoquinas como el  $\text{IFN}\gamma$  (sintetizado por linfocitos  $T_H$  y NK) y el  $\text{TNF}\alpha$  (auto- y paracrinamente), adquiriendo un fenotipo M1 o de “activación clásica” con carácter altamente microbicida (Ilustración IV). Estos macrófagos M1 se caracterizan por ejercer funciones como células presentadoras de antígenos y células inmunomoduladores a través de la expresión de citoquinas inflamatorias (IL-12, IL-1, IL-6 y  $\text{TNF}\alpha$ , en el caso de humanos también IL-23) y mediadores inflamatorios como COX-2 (que producirá prostaglandinas pro-inflamatorias) y NOS-2 (que producirá óxido nítrico que dará lugar a

radicales de nitrógeno, RNS) y radicales de oxígeno (ROS). Además, adquirirán una alta capacidad fagocítica que les permitirá ejercer actividades anti-proliferativas y citotóxicas (Van Genderachter *et al.* 2006) fagocitando neutrófilos apoptóticos y *debris*.



**Ilustración IV. Propiedades generales de macrófagos polarizados M1-M2.** Los macrófagos con activación clásica o M1 producen un repertorio de moléculas clásicamente pro-inflamatorias y anti-proliferativas. Los macrófagos con activación alternativa o M2 muestran un continuo de estados funcionales preferentemente anti-inflamatorio y pro-proliferativo (M2a, M2b y M2c) (Adaptado de Benoit *et al.* 2008).

Así, en la fase de iniciación o temprana se produce el edema y la acumulación extravascular de neutrófilos (PMN) que liberan citoquinas pro-inflamatorias como las prostaglandinas y leucotrienos. A medida que avanza el proceso, la migración de neutrófilos va disminuyendo y compensándose con la de monocitos y linfocitos, produciéndose gradualmente un aumento de la síntesis de mediadores anti-inflamatorios y pro-resolución como son las lipoxinas, resolvinas y protectinas (recientemente caracterizadas, Serhan *et al.* 2008). Además, en respuesta a citoquinas tipo II como IL-4 e IL-13, citoquinas desactivadoras como IL-10 y TGFβ, hormonas como los glucocorticoides y la vitamina D3 y la presencia de los propios neutrófilos apoptóticos, los macrófagos cambiarán su perfil inflamatorio (M1) y acabarán por adquirir mayoritariamente un fenotipo M2 (anti-inflamatorio) que promueve la reparación del tejido (Ilustración IV e Ilustración V) participando activamente en la llamada fase de resolución de la inflamación. Finalmente los macrófagos que no mueran podrán volver al sistema linfático (Imhof *et al.* 2004; Serhan *et al.* 2008) (Ilustración V).



**Ilustración V. Diferenciación, distribución y activación de los macrófagos *in vivo*.** Las células progenitoras mieloides se dividen y maduran bajo el efecto de citoquinas como M-CSF y GM-CSF y otras interacciones en los órganos hematopoyéticos. Los monocitos resultantes de esta maduración alcanzan virtualmente todos los tejidos donde se diferencian y especializan aparentemente de forma irreversible, serán la primera línea respuesta defensiva ante cualquier agente inflamatorio que alcance el tejido, sufrirán activación local a M1 o M2 según las necesidades. El reclutamiento de monocitos y precursores de la médula ósea lleva a la acumulación de macrófagos activados en el tejido inflamado (Adaptada de Gordon 2003).

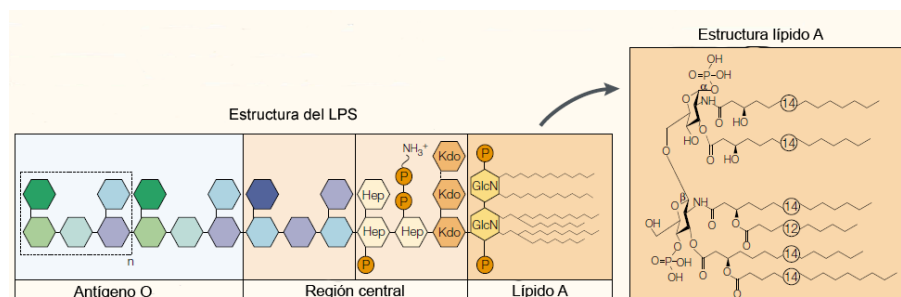
## 1.5 Choque séptico y TLR4

La sepsis es una de las principales causas de muerte en el mundo y una de las principales amenazas para los pacientes en cuidados intensivos. Se trata de un síndrome clínico complejo que implica la activación y disfunción del sistema innato y el adaptativo (Tsujimoto *et al.* 2008), asociado a un programa excesivo y prolongado de fenotipo M1 (Ilustración IV) que lleva al daño tisular y fallo multi-orgánico (Benoit *et al.* 2008). El choque séptico (o endotóxico) o síndrome séptico es la respuesta inflamatoria grave y sistémica (multiorgánica) desencadenada por la interacción gérmenes Gram-positivos o Gram-negativos con los macrófagos y otras células del organismo afectado (Morrison *et al.* 1987). El síndrome clínico se caracteriza por fiebre, escalofríos, taquicardia, taquipnea, hipotensión y disfunción de miocardio. La sepsis evoluciona con frecuencia a la disfunción multiorgánica, aumentando el riesgo de muerte un 15-20% por cada órgano afectado durante una sepsis grave.

Uno de los principales responsables del desencadenamiento de la sepsis es el LPS, principal componente de la membrana externa de bacterias Gram-negativas y además



principal iniciador microbiano de la inflamación (Cohen 2002). El LPS, también llamado endotoxina, es un complejo glucolipídico compuesto por un motivo hidrofílico de tipo polisacárido (Antígeno O), una parte central y otro dominio hidrofóbico conocido como lípido A (Ilustración VI). Este patrón molecular es común y está altamente conservado en los microorganismos, aunque dependiendo de la especie bacteriana la composición del antígeno O varía significativamente, el lípido A por el contrario solo presenta pequeñas variaciones en el patrón de fosfatos, composición de ácidos grasos (Akira *et al.* 2006) y se trata de la zona principal que reconoce el sistema innato.



**Ilustración VI. Estructuras primarias del LPS y Lípido A.** GlcN,  $\alpha$ -glucosamina; Hep, L-glicero- $\alpha$ -mano-heptosa; Kdo, ácido 2-ceto-3-desoxi-octulosónico; P, fosfato (Adaptado de Beutler, B. *et al.* 2003).

Las primeras estructuras descritas que unen LPS son el receptor opsónico CD14 y la proteína sérica LBP (*LPS-Binding Protein*) (Wright *et al.* 1990). Sin embargo, estas proteínas no son capaces de disparar una respuesta celular por si mismas al unir LPS. Para ello es necesaria su interacción con receptores TLR. Fue en 1997 cuando se demostró que la activación del TLR4 de mamíferos activaba a NF $\kappa$ B (Medzhitov *et al.* 1997) Posteriormente, se comprobó que este era el gen responsable de la iniciación de la sepsis por respuesta a LPS (Qureshi *et al.* 1999).

## 2 NUEVOS REGULADORES DE LA INMUNIDAD INNATA: PAPEL DE LOS GENES SUPRESORES DE TUMORES

En los últimos años se ha continuado explorando el papel biológico de la inmunidad, pero ya no solo como defensa ante agentes patógenos o agresiones externas, sino también profundizando en su vinculación con otros fenómenos patológicos como es el cáncer.

En este sentido, otras moléculas claves en la regulación del ciclo celular y la supresión de tumores empiezan a destacar como potenciales moduladores de la inmunidad al ser capaces de desempeñar un papel clave en la actividad antiviral. Es el caso del primer gen supresor tumoral descubierto, Rb (Classon *et al.* 2002) y los dos genes más frecuentemente mutados en cánceres humanos, p53 (Greenblatt *et al.* 1994) y Arf (Ruas *et al.* 1998). Estas tres proteínas son activadas por IFNs tipo I, que son moléculas fundamentales producidas en respuesta a las infecciones víricas (Takaoka *et al.* 2003; Munoz-Fontela *et al.* 2005; Garcia *et al.* 2006; Garcia *et al.* 2009):

Así, RB está implicada en la activación de la vía anti-viral a través de NFκB, ya que en ausencia de este supresor tumoral IκBα no se degrada adecuadamente y la infección viral progresa más eficientemente que en condiciones normales (Garcia *et al.* 2009).

Con respecto a p53 el mecanismo implicado en su acción anti-viral conllevaría primero la activación de la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias IFN tipo I y probablemente otros genes relacionados, y posteriormente la inducción de la apoptosis de la células infectadas, dificultando así la expansión viral (Takaoka *et al.* 2003; Munoz-Fontela *et al.* 2008). Sin embargo, por otro lado en relación a su papel en inmunidad, a p53 también se le atribuyen funciones anti-inflamatorias, ya que este supresor tumoral es capaz de regular negativamente la transcripción de genes activados por NFκB como IL-6, COX-2 y NOS-2 e incluso reprimir el propio promotor de NFκB (Komarova *et al.* 2005).

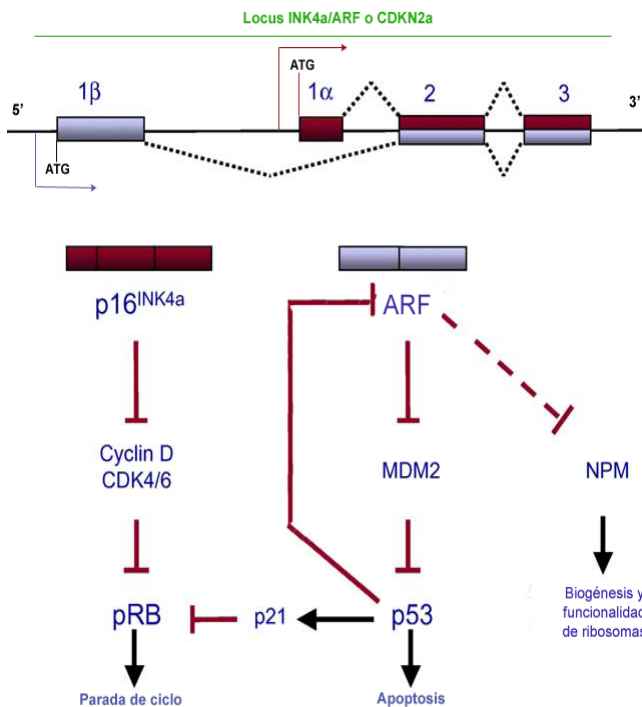
En el caso de ARF existen datos que muestran el aumento de su expresión tras infección viral o tratamiento con IFNs tipo I (Ries *et al.* 2000; Sandoval *et al.* 2004) así como su papel crítico en la respuesta anti-viral, a través de la activación de la proteína PKR (*dsRNA-dependent Protein Kinase*) y la vía de IκBa (Garcia *et al.* 2006). Estos datos junto con su elevada promiscuidad de interacción con otras moléculas (Gallagher *et al.* 2006) y sus crecientes funciones independientes de p53 (Weber *et al.* 2000; Sherr 2006) la convierten en una prometedora candidata para desempeñar funciones relevantes en respuesta inmune.

En este sentido, la intención de este trabajo de tesis doctoral es profundizar sobre el papel de ARF en respuesta inflamatoria al no existir todavía ningún dato que vincule directamente a este supresor tumoral con el proceso inflamatorio. Veamos a continuación de forma resumida, la información más relevante descrita hasta ahora acerca de este particular supresor tumoral.

## 2.1 El locus Ink4a/Arf y la proteína ARF

- **Locus Ink4a/Arf**

El locus Ink4a/Arf (de *Inhibitor of CDK4/Alternative Reading Frame*) también llamado Cdkn2a (de *Cyclin-Dependent Kinase N2*) o Mts1 (de *Multiple Tumor Suppressor*) está presente en eucariotas, desde pollos a humanos. En humanos se localiza en el cromosoma 9p21 (ENSG00000147889) y en ratones en el cromosoma 4 (ENSMUSG00000044303). Este locus representa un caso casi único en el genoma de eucariotas (Landry *et al.* 2003), ya que tiene dos promotores (para los exones 1 $\alpha$  y 1 $\beta$ ) que codifican 2 proteínas completamente distintas, p16INK4a y ARF (en ratones, [ENSMUSP000000061847](#) y [ENSMUSP000000030237](#) respectivamente). Esta última se designa p19ARF en ratones y p14ARF en humanos (por sus movilidades electroforéticas). Aunque comparten los exones 2 y 3, no muestran ninguna homología en sus secuencias aminoacídicas, ya que se transcriben en distintas pautas de lectura (de ahí el nombre ARF, del inglés *Alternative Reading Frame*) (Duro *et al.* 1995; Quelle *et al.* 1995; Sharpless 2005) (Ilustración VII). A pesar de su nula semejanza proteica, curiosamente, los dos productos de este locus, p16INK4a y ARF tienen funciones estrechamente relacionadas, ya que ambas son capaces de actuar como supresores tumorales al regular la vía de RB y p53 respectivamente (Ilustración VII). Ambas participan en el control de los programas de parada de ciclo y de senescencia, sin embargo su regulación y/o coregulación todavía presenta muchas incógnitas. Además en esta dirección están apareciendo nuevas investigaciones que amplían las funciones ejercidas por las dos proteínas, y algunas de ellas podrían estar fuera del contexto de ciclo celular (Garcia *et al.* 2006)



**Ilustración VII: Estructura del locus INK4A/ARF y principales vías de señalización de sus productos de traducción.** Las pautas de lectura abiertas en el locus INK4a/ARF dan 2 productos de traducción con un primer exón exclusivo y un segundo exón común pero con distinta secuencia aminoacídica. p16INK4a (en rojo) inhibe la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas 4 y 6 (CDK4/6), que son las que fosforilan a RB, lo que provoca la parada de ciclo celular. ARF (en azul) disminuye la degradación de p53 al inhibir a MDM2, lo que provoca la activación de vías apoptóticas y de p21 que actúa también como inhibidor de CDKs. Además, ARF es capaz de inhibir a la nucleofosmina (NPM) que es regulador de la función ribosomal (Modificado de Sharpless 2004).

## • La proteína ARF

La proteína ARF muestra numerosas particularidades biológicas como veremos a continuación:

- ARF está compuesta por un 20% de residuos de arginina (positivamente cargados, de ahí su punto isoeléctrico (PI) tan elevado, ver Tabla II) y contiene poquísimos o ningún residuo de lisina. Estos residuos de Arg están repartidos igualmente a lo largo del exón 1β y el exón 2.
- Estas características estructurales la convierten en una molécula altamente inestable en cualquier medio biológico por lo que es muy probable que siempre necesite formar complejos con otras moléculas a pH fisiológico y de hecho se considera que es una proteína muy “promiscua” ya que se ha demostrado que es capaz de interactuar, al menos *ex vivo*, con más de 25 proteínas distintas (Gallagher *et al.* 2006).
- Otra particularidad de esta pequeña proteína es que no contiene ningún motivo estructural conocido (desde pollos a mamíferos), de hecho no guarda homología significativa con ninguna otra proteína conocida y está pobremente

conservada, por ejemplo; humanos y ratones solo comparten un 50% de identidad aminoacídica. Además cuando ARF (eucariota) se intenta traducir en bacterias es altamente insoluble y se traduce inadecuadamente (DiGiammarino *et al.* 2001; Sherr 2006).

	Características de p19ARF (ratón)
<b>Carga:</b>	32,0
<b>Punto isoeléctrico:</b>	12,6672
<b>Peso Molecular:</b>	19 238,37 Daltons
<b>Número de residuos:</b>	169

**Tabla II. Características estructurales del péptido de p19ARF de ratón.** (Adaptado de ENSEMBL).

- Tanto p19ARF, en ratones, como p14ARF, en humanos, tienen una vida media de 6 a 8 horas, y aunque no contengan residuos de lisina, se poliubiquitinan en el extremo N-terminal y son degradadas por el proteasoma. Además esta regulación post-traducciona no es dependiente ni de p53 ni de MDM2, pero sí de nucleofosmina (Kuo *et al.* 2004).

- Se trata de una proteína principalmente nucleolar que no se expresa de forma significativa en condiciones basales celulares. Sin embargo, cuando se dan factores como es la sobre-expresión de oncogenes (ver en detalle más adelante), aumenta la expresión de ARF que se acumula principalmente en el nucleolo, lugar de transcripción del rRNA (RNA ribosómico), formación de ribosomas y transporte de los mismos. Aquí, la proteína ARF se asocia en complejos de alto peso molecular junto a la proteína nucleofosmina (NPM o B23) que entre otras funciones parece que estabiliza el plegamiento y la vida media de ARF (Bertwistle *et al.* 2004).

### 2.2 Papel biológico de ARF

#### 2.2.1 Funciones anti-proliferativas

Desde que en 1995 se descubriese que en células tumorales el locus p16Ink4a transcribía para otro mRNA aparte del de p16, tanto en humanos (Duro *et al.* 1995; Mao *et al.* 1995; Stone *et al.* 1995) como en ratones (Quelle *et al.* 1995, quienes acuñaron el término de ARF), se ha comprobado que las alteraciones en este locus (afectando a las 2 proteínas) aparecen entre el 20-40 % de los melanomas y linfomas hereditarios humanos (Ruas *et al.* 1998; Harland *et al.* 2005; Sharpless 2005; Gallagher *et al.* 2006), y se ha comprobado que ambas proteínas actúan como supresores tumorales (Ilustración VII). Las mutaciones que afectan exclusivamente al exón 1 $\beta$  y por tanto a p14Arf, son mucho menos frecuentes, aunque, sí se han detectado en determinados tipos de melanomas y tumores del sistema neural (Randerson-Moor *et al.* 2001; Laud *et al.* 2006). Por otro lado, el silenciamiento del promotor de Arf mediante hipermetilación se observa frecuentemente en distintos tipos de cánceres humanos, astrocitomas, tumores oligodendrogiales, del epéndimo, de riñón, carcinomas hepatocelulares y de células escamosas, etc. (Saporita *et al.* 2007). Los ratones deficientes para Arf desarrollan tumores espontáneos aproximadamente a partir de las 8-11 semanas de edad y son altamente susceptibles a la activación de oncogenes, a la radiación y a los carcinógenos químicos (Kamijo *et al.* 1997; Kamijo *et al.* 1999). Además la introducción ectópica de ARF es capaz de detener el ciclo de líneas celulares y células tumorales humanas (Liggett *et al.* 1996; Quelle *et al.* 1997). Todo ello convierte a ARF en un claro y potente supresor tumoral tanto en humanos como en ratones.

Como hemos mencionado anteriormente, ARF no se expresa a niveles detectables en la mayoría de los tejidos en condiciones de crecimiento celular fisiológico normal. En este contexto, el promotor se mantiene silenciado gracias a los reguladores negativos tipo Polycomb como BMI1 (Jacobs *et al.* 1999; Bracken *et al.* 2007), otros como TBX2 y TBX3 o ATM (Gil *et al.* 2006), TWIST (Maestro *et al.* 1999), RB (Bates *et al.* 1998; Rowland *et al.* 2002) y por el propio p53, que inhibe la transcripción de Arf en una auto-regulación negativa de la cascada de activación de p53 (Robertson *et al.* 1998; Stott *et al.* 1998). Además recientemente se ha descubierto un origen de replicación común a los genes Ink4b, p16Ink4a y Arf que actúa como dominio regulador de la expresión conjunta

de los tres genes y sobre el que intervienen principalmente modificaciones de la heterocromatina (Gonzalez *et al.* 2006).

La expresión de ARF se activa en numerosos tipos celulares solo en determinadas condiciones, como son, la elevada activación de señales proliferativas como cultivo continuado *in vitro* de MEFs (Kamijo *et al.* 1997) o el estrés oncogénico [expresión inapropiada de: v-ABL (Radfar *et al.* 1998), c-MYC (Zindy *et al.* 1998), E1a (de Stanchina *et al.* 1998), E2F (Zhu, 1999 #224; Dimri *et al.* 2000), RAS (Palmero *et al.* 1998; Groth *et al.* 2000)], también aumenta su expresión en ciertos tejidos murinos en envejecimiento (Krishnamurthy *et al.* 2004) como un mecanismo de protección frente al envejecimiento (Matheu *et al.* 2007; Baker *et al.* 2008), o por acción de señales pro-apoptóticas como el NO (Kaji *et al.* 2002; Zeini *et al.* 2006) o los radicales de oxígeno (Ito *et al.* 2006).

#### ▪ **Supresor tumoral dependiente de p53**

El principal modo de acción anti-tumoral que se conoce de ARF es a través de la regulación de la vía del supresor tumoral p53. Una vez activado, ARF inhibe las actividades ubiquitina-ligasas de MDM2 (Stott *et al.* 1998; Honda *et al.* 1999) y de ARF-BP1/Mule (Chen *et al.* 2005). Estas proteínas participan en la degradación de p53, por lo que su inhibición permite la estabilización del factor de transcripción (Pomerantz *et al.* 1998; Toledo *et al.* 2006) y este es capaz de activar programas de parada de ciclo celular (Zhang *et al.* 1998), senescencia en ratones (Kamijo *et al.* 1997) (los datos indican que en humanos p14ARF no es necesaria para la entrada en senescencia (Wei *et al.* 2001)) y apoptosis (Zindy *et al.* 1998) (Ilustración VII). En resumen, en este contexto, a ARF se le atribuye el papel de sensor de señales híper-proliferativas para disparar la potente respuesta anti-tumorogénica debida a p53. Esta importante vía de señalización está finamente regulada, y así por ejemplo, p53 activo es capaz de disminuir la expresión de ARF, por lo que las células deficientes en p53 expresan mayores niveles de ARF incluso en condiciones basales. Debido a esta relación con p53, la desactivación de ARF por mutación mimetiza en gran medida la pérdida de función de p53 acelerando la tumorogénesis provocada por oncogenes (Sherr 2006).

Por otro lado, se ha demostrado que ARF es capaz de potenciar también la actividad de p53 favoreciendo su fosforilación e inhibiendo la actividad transcripcional antagónica de NFκB (p65) (Rocha *et al.* 2003).

### ▪ **Supresor tumoral independiente de p53**

Cada vez son más las funciones independientes de p53 atribuidas a ARF. Así, los ratones que carecen de p19Arf, tienen un mayor número de tumores espontáneos y de distinto tipo que los ratones deficientes exclusivamente para p53 (alrededor del 70% de los cánceres en ratones p53<sup>-/-</sup> son linfomas de células T y los Arf<sup>-/-</sup> sufren mayoritariamente sarcomas y otros tipos tumorales (Jacks *et al.* 1994 Kamijo *et al.* 1999; Sherr 2006). Así mismo, los animales triple-deficientes para Arf, Mdm2 y p53 desarrollan tumores mucho más rápido, siendo estos tumores frecuentemente de distintos tipos que los de animales que solo carecen de Mdm2 y p53 (Weber *et al.* 2000). Además la sobre-expresión de ARF es capaz de provocar la parada del ciclo celular en fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) que carecen de p53 (Weber *et al.* 2000; Eymen *et al.* 2003). Todo ello indica que ARF debe ser capaz de desempeñar su función de supresor tumoral también de una forma independiente de p53 (Kelly-Spratt *et al.* 2004). En las fases tempranas del desarrollo del cáncer, p19ARF parece inhibir la tasa de crecimiento de los tumores de una forma p53-independiente (Sherr 2006).

Un candidato propuesto para mediar la parada de crecimiento celular en ausencia de p53 es ARF-BP1 ya que ARF se une a ella de forma mayoritaria en ausencia de p53 y su desactivación detiene la división celular (Chen *et al.* 2005).

### ▪ **Anti-proliferativo en el desarrollo**

Aunque ARF no se expresa a niveles detectables durante la mayoría del desarrollo del ratón, existe una excepción en el tejido vítreo del ojo, donde la expresión transitoria de p19ARF es capaz de regular la regresión del sistema vascular hialoide (McKeller *et al.* 2002). Este fue el primer descubrimiento que mostraba una función de ARF distinta a la de supresor tumoral. De hecho los ratones deficientes para p19ARF son ciegos tras el nacimiento. El mecanismo detrás de esta regulación parece ser el bloqueo de la expresión del receptor  $\beta$  del factor de crecimiento plaquetario (PDGF) de una manera independiente de MDM2 y p53 (McKeller *et al.* 2002; Silva *et al.* 2005).



### 2.2.2 Función anti-viral

Independientemente de la función anti-proliferativa de ARF, se ha descrito que la expresión de este gen está activada por virus e IFN tipo I (una de las principales moléculas producidas durante las infecciones víricas) (Ries *et al.* 2000; Sandoval *et al.* 2004). Por otro lado, trabajos del grupo del Dr. Serrano (García *et al.* 2006) demostraron que esta acumulación de ARF protege a las células y a los ratones de la infección viral, apuntando a una posible función antiviral de este gen, independiente de p53. Esta función defensiva la ejercería a través de la activación de PKR que es capaz de fosforilar a I $\kappa$ B $\alpha$  e IF2 $\alpha$ . Esta activación de PKR se llevaría a cabo gracias a la unión entre ARF y nucleofosmina.

## 2.3 Mecanismos de acción de ARF

Las particularidades estructurales de esta proteína la convierten en un desafío mecánico desde el punto de vista bioquímico y de sus interacciones moleculares. Hasta el momento, se sabe que ARF interviene modulando la actividad de otras moléculas efectoras como enzimas y factores de transcripción. Así, es capaz de inhibir o favorecer actividades enzimáticas al unirse a determinados dominios de sus proteínas diana. Mostramos aquí algunos de los más reseñables, pero la lista sigue creciendo.

### 2.3.1 Actividad anti-ubiquitina-ligasa y secuestro en el nucleolo

Uno de los mecanismos biológicos con más relevancia llevado a cabo por ARF es la inhibición de actividad ubiquitina-ligasa y secuestro en el nucleolo descritos en su interacción con MDM2. El grupo de Yasuda (Honda *et al.* 1999) descubrió que ARF es capaz de inhibir esa actividad enzimática de MDM2 al unirse a su dominio activo. A la vez la unión con MDM2 impide su translocación al nucleoplasma, por lo que retenida en el nucleolo a través de por su anclaje a ARF, MDM2 es incapaz de unirse a p53 (activa en el nucleoplasma), impidiendo que p53 sea marcada para su degradación en el proteasoma (Weber *et al.* 1999).

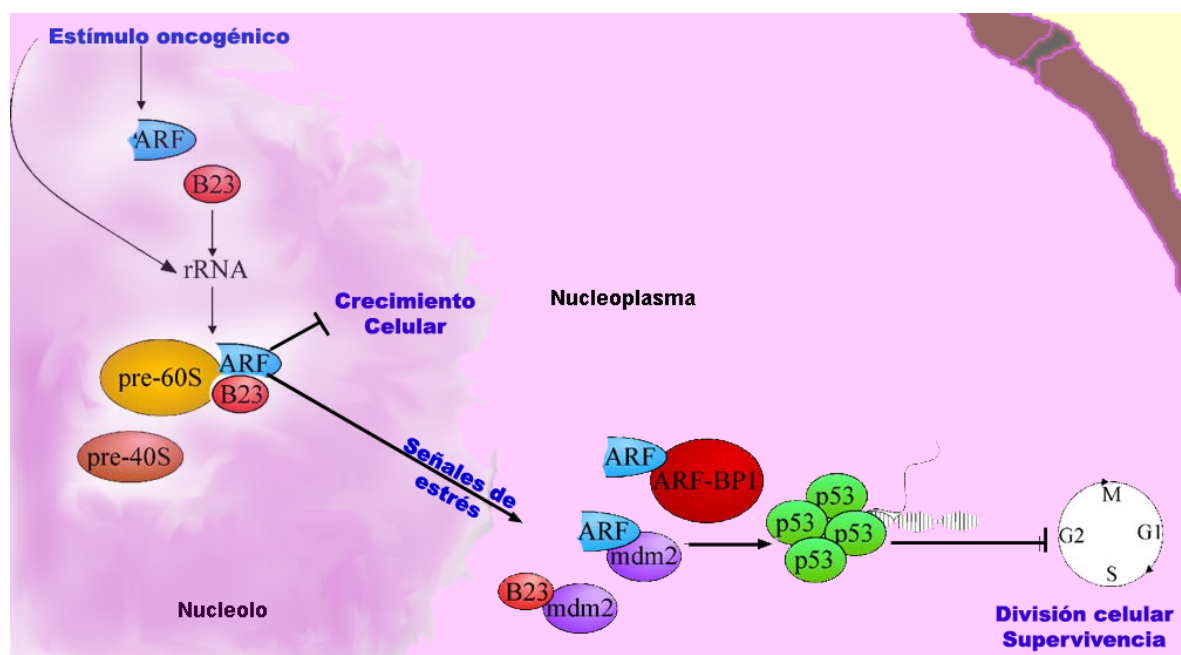
### 2.3.2 Sumoilación

ARF participa en fenómenos de sumoilación, es decir, es capaz de favorecer la unión de pequeñas proteínas tipo ubiquitina (SUMO-1) llevada a cabo por enzimas E1 activadoras, E2 conjugadoras y E3 ligasas. Esta modificación postraduccional cursa por una vía independiente a p53 y podría ser una función clave de la proteína ARF en condiciones basales (Tago *et al.* 2005). La sumoilación puede causar alteraciones en el transporte de la proteína afectada, interferencias con su ubiquitinación y reciclado, cambios en la reparación del DNA y la cohesión de cromátidas hermanas, así como alteraciones en la expresión génica (normalmente regulación a la baja) (Johnson 2004). Algunas de las proteínas que sufren sumoilación por efecto de ARF son MDM2, E2F1 y nucleofosmina (Xirodimas *et al.* 2002; Rizos *et al.* 2005) (Tago *et al.* 2005). Se conoce muy poco acerca del significado funcional fisiológico de la sumoilación llevada a cabo por ARF; ni siquiera cuál es su papel en las funciones de supresión tumoral ejercidas por ella misma (Rizos *et al.* 2005; den Besten *et al.* 2006), pero sin duda las múltiples consecuencias funcionales que podría tener la sumoilación en distintas dianas asociadas a ARF, proporciona una amplia versatilidad a posibles nuevos efectos biológicos.

### 2.3.3 Control ribosomal

Como hemos visto, ARF es predominantemente una proteína nucleolar y parece intervenir en la regulación de la biogénesis de ribosomas retardando el procesamiento de los precursores de RNA ribosómico, 47S/45S y 32S (Sugimoto *et al.* 2003). Esta actividad es independiente de p53 y MDM2, pero no de nucleofosmina o B23 (Brady *et al.* 2004; Sharpless 2005). La nucleofosmina es una endorribonucleasa necesaria para la maduración del rRNA 28S que interacciona con numerosas proteínas celulares entre las que destacan p53 y MDM2. La función exacta del complejo ARF-B23 se desconoce, sin embargo parece que en ratones, ARF puede favorecer la ubiquitinación y degradación de la nucleofosmina (Itahana *et al.* 2003), inhibiendo así el transporte de rRNA al citosol (Brady *et al.* 2004; Yu *et al.* 2006). Paradójicamente en este caso, la inducción de parada de ciclo por p19ARF se asocia con menores disminuciones de nucleofosmina (Korgaonkar *et al.* 2005). En el caso de los humanos, p14ARF no afecta a la expresión de nucleofosmina (Bertwistle *et al.* 2004; Gallagher *et al.* 2006). Además de nucleofosmina, se ha descubierto que ARF puede localizarse en los promotores de loci de rDNAs e interactuar con UBF, un potente

inductor de la transcripción de rDNA (Ayrault *et al.* 2004). La hipótesis más sostenida es que estos efectos inhibitorios en la biogénesis ribosomal contribuirían a la parada de ciclo celular y además, la propia asociación nucleolar con la nucleofosmina podría favorecer la interacción con MDM2 y ARF-BP1. Estudios recientes muestran que también en condiciones basales ARF estaría interviniendo en el mantenimiento de la estructura del nucleolo y como regulador negativo del procesamiento y liberación de rRNA desde el nucleolo (Apicelli *et al.* 2008). Estos estudios sostienen por lo tanto, que incluso a los reducidos niveles a los que se encuentra la proteína en células en interfase, ARF tendría un papel fundamental como vigilante constata de la homeostasis nucleolar. La disgregación del nucleolo durante la mitosis o determinados estreses permiten que ARF se libere de forma transitoria al nucleoplasma donde podría tener cierta actividad biológica (David-Pfeuty *et al.* 2002; Lee, C. *et al.* 2005) aunque su estabilidad aquí es muy reducida (Rodway *et al.* 2004).



**Ilustración VIII. Modelo del mecanismo de acción de ARF en el nucleolo y nucleoplasma.** (Adaptado de Gallagher *et al.* 2006)

### 2.3.4 Actividad mitocondrial

Recientemente se ha demostrado que el mRNA de ARF de humanos puede iniciar su traducción desde un codón de metionina interno produciéndose una forma corta de la proteína ARF que carece de los 47 aminoácidos N-terminales (44 en el caso de ratón) (Reef *et al.* 2006). Esta forma llamada smARF (*small mitochondrial ARF*) se localiza en la mitocondria y es incapaz de unirse a MDM2 o a nucleofosmina y por lo tanto no es capaz de afectar a la vía de p53 o a la biogénesis de ribosomas. Esta forma mitocondrial se ancla a la mitocondria a través de la proteína p32 (Reef *et al.* 2007). Igual que la proteína ARF, la smARF no se expresa a niveles detectables en condiciones basales, para que esto ocurra es indispensable la ausencia de p53 (Reef *et al.* 2006) u otras señales oncogénicas activas. Sin embargo, esta forma corta no parece representar más que un 5% de la cantidad de ARF total. Además es muy difícil de detectar en la mitocondria y no se descarta su presencia en otros orgánulos (Itahana *et al.* 2008). Posteriormente se demostró que la proteína de cadena completa ARF también era capaz de localizarse en la mitocondria unida a p32, sin embargo apenas alcanza el 5% de la proteína total distribuida en el núcleo y varía mucho según el tipo celular (Itahana *et al.* 2008). La función de estas formas mitocondriales se ha asociado con la bajada del potencial de membrana mitocondrial, de una forma independiente de p53 (Reef *et al.* 2006; Itahana *et al.* 2008). Sin embargo, a día de hoy, quedan muchas incógnitas por resolver acerca de la implicación de estas formas mitocondriales en la apoptosis o la autofagia en respuesta a estrés oncogénico e incluso en el proceso de supresión tumoral. Así mismo, se plantean muchas dudas sobre cuál es el mecanismo de translocación a la mitocondria y dónde se sitúa exactamente o cómo es capaz de alterar el potencial de membrana.

### 2.3.5 Unión a múltiples proteínas celulares

Debido a sus características físicas la proteína de ARF es muy inestable y tiene tendencia a formar complejos con múltiples proteínas de su contexto subcelular. La lista de proteínas identificadas que son capaces de interaccionar con ARF sigue creciendo (Sherr 2006), sin embargo la mayoría de estas asociaciones solo se han demostrado *in vitro* y queda mucho por dilucidar respecto a su papel funcional *in vivo*, pero abren sin duda un interesante campo de estudio. Como dato sugerente hay que indicar que el 50% de la

proteína ARF basal está unida a nucleofosmina (Apicelli *et al.* 2008). En la tabla se recogen algunos de los ejemplos reseñables de proteínas que interaccionan con ARF.

Proteínas que se unen a ARF	
Proteína	Efecto biológico debido a la asociación con ARF
APA-1	Sin efecto aparente
ARF-BP1/Mule1	Inhibición de la actividad ubiquitina-ligasa de ARF-BP1
B23/Nucleofosmina	Inhibición de la translocación de B23. Degradación de B23.
BCL6	Inhibición de la actividad transcripcional de BCL6
CARF	Potenciación de la parada de ciclo mediada por ARF
c-MYC	Inhibición de la transactivación de c-MYC
DP-1	Inhibición de la protelisis de E2F inducida por ARF
E2F-1, -2, -3	Degradación de E2F
Foxm1b	Inhibición de la transactivación de Foxm1b
HIF-1 $\alpha$	Inhibición de la transactivación de HIF-1 $\alpha$
Mdm2	Inhibición de la actividad ubiquitina-ligasa de Mdm2
MdmX	Potenciación de la transactivación de p53
Neurabina	Potenciación de la parada de ciclo mediada por ARF
p120 <sup>E4F</sup>	Potenciación de la parada de ciclo mediada por ARF
Pex19p	Inhibición de p19ARF (pex19p no une p14ARF)
Tat-binding protein-1	Estabilización de ARF
Topoisomerasa I	Potenciación de la actividad topoisomerasa I
Ubc9	Probable implicación en la sumoilación mediada por p14ARF
Helicasa de Werners	Exclusión nuclear de la helicasa de Werners
p32	Anclaje de ARF a la mitocondria. Disminución del potencial de membrana mitocondrial.

**Tabla III. Proteínas que se unen a ARF y los efectos biológicos de esta unión.** (Adaptada de Gallagher *et al.* 2006)



*Objetivos*

---





El objetivo principal de este trabajo de tesis doctoral ha sido analizar el papel del gen supresor de tumores Arf en la regulación de la respuesta inmunitaria innata y de forma concreta en el proceso inflamatorio. Para llevarlo a cabo, los objetivos propuestos para el desarrollo de esta tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Evaluar el efecto de la ausencia de ARF en el proceso inflamatorio inducido por ligandos de los TLRs en células macrofágicas murinas.
2. Analizar el papel de la vía ARF-p53 en la señalización a través de los TLRs en células macrofágicas murinas.
  - a. Analizar el efecto de la deficiencia de ARF en la vía de NFκB.
  - b. Analizar el efecto de la deficiencia de ARF en la vía de las MAPKs.
3. Caracterizar la funcionalidad de los macrófagos deficientes en ARF, mediante el estudio de la expresión de moléculas de superficie y su capacidad de adhesión.
4. Determinar el papel de ARF en fenómenos inflamatorios *in vivo* mediante diversos abordajes experimentales:
  - a. Cuantificar la migración, expresión de moléculas de adhesión y capacidad de adhesión de las poblaciones leucocitarias migradas al peritoneo inflamado tras inyección con tioglicolato en un modelo clásico de inducción de peritonitis en ratón.
  - b. Determinar el papel de ARF en el grado de inflamación debida a agentes irritantes tópicos (administración de TPA en oreja de ratón).
  - c. Analizar el papel de ARF en la evolución del choque séptico en un modelo murino. Evaluación de la supervivencia, del daño tisular y de la liberación de mediadores inflamatorios.



## *Materiales y Métodos*



## 1 MATERIALES

### 1.1 Reactivos

Los reactivos empleados para la realización de los experimentos reflejados en esta memoria fueron adquiridos en las siguientes fuentes:

- Los medios de cultivo celular DMEM y RPMI se adquirieron en Sigma. El suero fetal bovino (FBS) fue de Invitrogen Life Technologies.
- Los ligandos purificados de los distintos TLRs fueron comprados en InvivoGen: El lipopolisacárido (LPS) 0111:B4 ultrapuro o libre de endotoxinas de *Escherichia coli*, el ácido lipoteicoico (LTA) purificado de *Staphylococcus aureus*, el ácido poli-inosinico-policitidilico (poly (I:C)) y el cisteín- guanosin ácido desoxirribonucleico (CpG-DNA). El LPS utilizado para los ensayos *in vivo* fue el de *E.coli* serotipo B5:055 adquirido en Sigma.
- El inhibidor específico de NOS-2, 1400W, y el donador de óxido nítrico GSNO fueron adquiridos en Alexis Biochemicals.
- En la extracción de RNA se usó el reactivo TRIzol de Invitrogen (Life Technologies).
- El *microarray* de expresión génica “*mouse RT2Profiler PCR Inflammatory Cytokines and Receptors array*” y “*RT2 First Strand Kit and SYBR Green/Fluorescein qPCR master mix*” fueron adquiridos en SABiosciences.
- El “*Difco Thioglycollate*” fue suministrado por Becton-Dickinson.
- El ensayo de ELISA de citoquinas “*Bio-Plex cytokine Assay*” era de BioRad.
- “*CytoCount counting beads*” fueron adquiridas en Dako.
- Citoquina de activación de endotelio TNF- $\alpha$  fue suministrada por PeproTech.
- El kit de nucleofección “*Mouse Macrophage Nucleofector Kit*” fue comprado a Lonza.
- Reactivo de transfección de DNA *in vitro* “*jetPEI in vitro DNA*” de Polyplus transfection.
- Sustratos de adhesión: Fibronectina (Sigma), Vitronectina (Sigma), Colágeno (Sigma) y BSA (Sigma)

En la siguiente tabla se indican los anticuerpos utilizados para *western-blot* y citometría. Indicamos la casa comercial y el número de catálogo.

Western-Blot		
MAPK totales	anti-p38 #9212, anti-JNK-SAPK #9252 y anti-ERKp44/42 #9102	Cell Signalling
MAPK fosforiladas	anti-phospho-p38(Thr180/Tyr182) #9211, anti-phospho-SAPK/JNK((T183/Y185) #4671 y anti-phospho-p44/p42(Thr202/Tyr204) #9101	Cell Signalling
Ruta NFκB	anti-IκBa (#sc-371), anti-NFκB p65 (#sc-109)	Santa Cruz
Enzimas inducibles	anti-NOS-II (#ab15323) y anti-COX-II (#ab15191)	AbCam
ARF	anti-p19 ARF (#ab80)	AbCam
p16	anti-p16(#sc-1207)	Santa Cruz
p53	anti-p53 (#sc-6243)	Santa Cruz
MDM2	anti-MDM2 (#sc-965)	Santa Cruz
E2F-1	anti-E2F1 (#sc-22820)	Santa Cruz
Control carga extracto total o citosol	anti-β-Actin (#A5441)	Sigma
Control carga extracto núcleo	anti-PSF (#P2860)	Sigma
Secundarios (unidos a peroxidasa de rábano picante, HRP):	Anti-Mouse (#31430)	Thermo Scientific
	Anti-Rabbit (#NA934)	GE Healthcare
Citometría		
CD44	FITC anti-Mouse CD44 (#553133).	BD Pharmigen
CD45	PE anti-Mouse CD45 (#553081)	BD Pharmigen
GR-1	Alexa Fluor® 647 anti-mouse Ly-6G (Gr-1)(#51-5931)	eBioscience
Integrinas	anti-Mouse CD29 (Integrin beta 1) (#14-0291), anti-Mouse CD61 (Integrin beta 3) (#14-0611), anti-Mouse CD80 PE (# 12-0801), anti-Mouse CD11b Cy5 (#19-0112), anti-Mouse CD11c PE-Cy7 (#25-0114)	eBioscience
MHC-II	anti-mouse MHC Class II FITC (#11-5321)	eBioscience
F4/80	anti-F4/80 PE-Cy5 (#15-480)	eBioscience
Secundarios	Alexa Fluor 488 anti-Rat (#A21470)	Molecular Probes
	Cy5 anti-Hamster (# NB120-6971)	Novus Biologicals

Tabla I. Anticuerpos utilizados para western-blot y citometría.

## 1.2 Animales

Todos los animales fueron mantenidos y tratados de acuerdo con los protocolos aprobados por el cuidado institucional y el comité para la investigación con animales del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares en consonancia con las Guías Comunitarias Europeas para la manipulación y uso de animales de laboratorio. Se mantuvieron libres de parásitos específicos y bajo condiciones controladas de luz, presión

y temperatura, permitiéndoles el acceso *ad libitum* de agua y comida. Para el mantenimiento de los animales se empleó una dieta estándar ligeramente enriquecida, proporcionada por Harlan.

Los estudios se llevaron a cabo en animales de 12 semanas de edad pertenecientes a 4 grupos distintos de ratones (todos con fondo genético C57BL/6J) con los siguientes genotipos: (1) cepa deficiente para el gen p19Arf, que denominaremos p19Arf  $-/-$  o KO (del inglés: *Knock-Out*) y que fueron generados según el protocolo descrito por Kamijo y Sherr en la publicación Kamijo *et al.* 1997;(2) cepa control, de la que deriva la primera, homocigoto para el gen p19Arf, que denominaremos WT (del inglés: “*wild type*”) y (3) cepa transgénica que sobreexpresa una copia extra del locus Ink4a/p19Arf, y el gen p15Ink4b llamados superInk4a/Arf o Arf tg/tg o TG, se generó como describen Matheu y Serrano (CNIO) en (Matheu *et al.* 2004) y (4) la cepa control de la que derivan los animales transgénicos, presentan las copias endógenas para todo el locus y que denominaremos también WT (del inglés: “*wild type*”); todas ellas, colonias cedidas por el Dr. Manuel Serrano (CNIO).

Los animales fueron sacrificados mediante inhalación por CO<sub>2</sub> para su utilización.

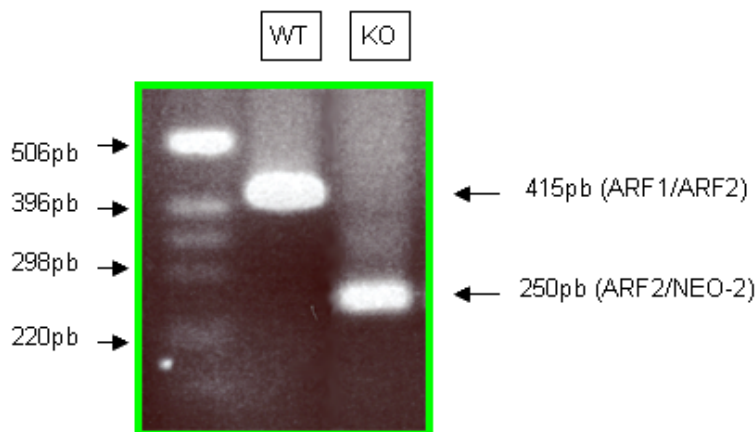
## 2 MÉTODOS

### 2.1 Análisis de genotipo

- Los ratones p19Arf KO y su línea control WT, de la que deriva, fueron genotipados por PCR utilizando el DNA extraído de una pequeña porción de la cola (ver siguiente apartado). Se utilizaron los reactivos de “HotMaster PCR kit de GE Healthcare”, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los oligonucleótidos o cebadores utilizados para el genotipaje fueron:

nombre	Secuencia (5' → 3')
NEO-2	ACCACACTGCTCGACATTGGG
ARF1	AGTACAGCAGCGGGAGCATGG
ARF2	TTGAGGAGGACCGTGAAGCCG

Tabla II. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para el genotipado de animales p19Arf KO y WT.



**Figura I. Bandas de PCR de genotipaje WT/KO.** Gel de agarosa al 1,2% donde en el primer carril se resolvió un patrón de distintos tamaños moleculares de DNA, en el segundo carril el producto de PCR del genotipaje de un animal WT y en el tercero el producto de PCR del genotipaje de un animal p19Arf KO. Se indican los tamaños moleculares del amplicón y la pareja de cebadores que hibridó con el DNA molde.

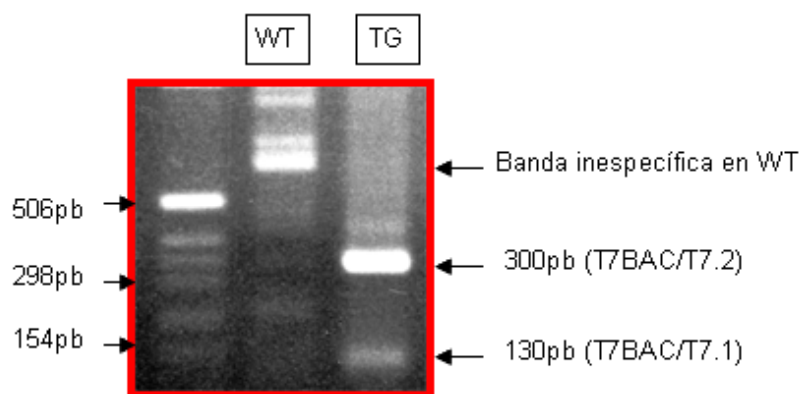
El alelo WT se indentificó por la reacción de amplificación entre los cebadores ARF1 y ARF2 (con un tamaño de amplicón de 415 pares de bases (pb)); el alelo KO se identificó por la reacción de amplificación entre los oligonucleótidos ARF2 y NEO-2 (dando un tamaño de amplicón de 250 pb) (Figura I).



- Los ratones superInk4a/Arf y su línea control o WT fueron genotipados de modo similar utilizando los siguientes cebadores:

nombre	Secuencia (5' → 3')
T7-BAC	TAATACCACTCACTATAGGG
T7.1	AGTCAGAGGGTGGATGGG
T7.2	AAGCACTGAACCACCAA

**Tabla III.** Secuencias de oligonucleótidos utilizados para el genotipado de animales superInk4a/Arf (TG) y WT.



**Figura II.** Bandas de PCR de genotipaje WT/TG. Gel de agarosa al 1,2% donde en el primer carril se resolvió un patrón de distintos tamaños moleculares de DNA, en el segundo carril el producto de PCR del genotipaje de un animal WT y en el tercero el producto de PCR del genotipaje de un animal TG. Se indican los tamaños moleculares y la pareja de cebadores que hibridó con el DNA molde.

Las parejas de cebadores que hibridan con la secuencia correspondiente al transgén son: T7-BAC (sentido) con T7.1 (antisentido) para dar un amplicón de 130 pb y T7-BAC (sentido) con T7.2 (antisentido) para dar uno de 300 pb (Tabla III).

Todas las reacciones de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) se desarrollaron en un termociclador Eppendorf® en las condiciones óptimas para cada pareja de cebadores. Los productos de amplificación se resolvieron posteriormente mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,2% y se visualizaron en un transiluminador de UVA tras ser teñidos con BrEt.

### 2.2 Extracción de DNA de cola de ratón

Un trozo de cola de ratón se incubó con 500 µl de tampón de lisis (Tris- HCl 50 mM, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, SDS 1% y proteinasa K 0,4 mg/ml ) a 55° C durante toda la noche. A la mañana siguiente se añadieron 500 µl de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1) y se agitó durante 2 min tras lo que se centrifugó 15 min a 15700 xg. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se añadieron 500 µl de isopropanol para precipitar el DNA. El precipitado se recogió por centrifugación y se lavó con etanol 70%. Tras una nueva centrifugación el precipitado final se resuspendió en agua y se valoró la concentración en el espectrofotómetro Nanodrop 1000.

### 2.3 Obtención de cultivos primarios

#### 2.3.1 Aislamiento y cultivo de macrófagos peritoneales

Para estimular la extravasación de células del sistema inmune innato al peritoneo, 4 días antes de la extracción de los macrófagos se administró 2,5 ml de tioglicolato (3% p/v) (Difco) mediante inyección intraperitoneal (i.p.) a los ratones para estimular la producción de células de tipo macrofágico (Den Otter *et al.* 1982; Zeini *et al.* 2006). Pasado este tiempo se sacrificaron los animales por saturación en ambiente con CO<sub>2</sub>. Se les retiró la piel de la cavidad abdominal y se les inyectaron 10ml de medio RPMI1640 frío a cada animal. Tras aplicar un masaje en la zona se recuperó el medio, rico ya en células, de la cavidad abdominal y se centrifugó a 400 x g a 4° C durante 5 min. El precipitado obtenido, compuesto fundamentalmente por macrófagos y linfocitos, se centrifugó a 400 x g a 4° C durante 5 min y se incubó 2 min a 37° C en tampón de lisis de eritrocitos (NH<sub>4</sub>Cl 155 mM, KHCO<sub>3</sub> 10 mM y Na-EDTA 0,1 mM, pH 7,3), se diluyó 10 veces en PBS (Tampón fosfato salino: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 4,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM, pH 7,5) se centrifugó y se lavó dos veces con PBS y se resuspendieron las células en RPMI 1640 suplementado con antibióticos (estreptomina y penicilina) y con 10% de suero bovino fetal (FBS), en el cual previamente se había inactivado el complemento por incubación a 55° C durante 30 min. Las células se sembraron (10<sup>6</sup> cel/cm<sup>2</sup>) y se mantuvieron durante 3h a 37° C. Transcurrido este tiempo se retiró el sobrenadante y se lavaron los platos con PBS frío con el fin de eliminar las células no adheridas a la placa (linfocitos). 12h antes de ser estimulados los macrófagos, el medio de cultivo se sustituyó por RPMI 1640 con 2% FBS.

### **2.3.2 Obtención y cultivo de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM)**

Para la obtención de precursores mieloides de médula ósea seguimos el protocolo de Meerpohl *et al.* 1976 con ligeras modificaciones. Se sacrificó a los animales en cámara de CO<sub>2</sub> y se les seccionaron las patas traseras a la altura de la cadera. A estas patas se les retiró toda la piel y el músculo, dejando el tejido óseo limpio. Las patas se mantuvieron en DMEM complementado con 10% FBS y antibióticos hasta ser procesadas (nunca más de 1 hora).

Para extraer las células de médula ósea se seccionó el fémur y la tibia de cada extremidad. Se separaron de la rótula y se cortaron los extremos de ambos huesos. Con una jeringuilla de 10ml y una aguja de 0,6mm de diámetro se inyectó DMEM suplementado con 10% FBS en uno de los extremos haciendo pasar el líquido vigorosamente a través de la cavidad medular para recogerlo en un tubo de 50ml (BD Falcon) con DMEM a 4° C. Este proceso se repitió hasta que el interior del hueso quedó limpio de médula. Una vez extraídas todas las células, se coló el medio a través de un tamiz de nylon de 70 µm (BD Falcon) para eliminar posibles restos de tejidos. A continuación se centrifugó a 400 x g a 4° C durante 5 min y se incubó 2 min a 37° C en tampón de lisis de eritrocitos (ver 2.3.1). Posteriormente se diluyó 10 veces en PBS y se centrifugó y se lavó dos veces con PBS resuspendiéndose las células en DMEM 10% FBS. Posteriormente se sembraron en botellas de cultivo de 150 cm<sup>2</sup> (Falcon) (1 botella por cada 4-5 patas) y se mantuvieron en las condiciones convencionales de cultivo a 37° C / 5% CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda durante 24 h. para favorecer la adhesión de fibroblastos, células maduras, etc. Tras este periodo se recuperó el medio de cultivo, que contiene las células no adheridas, se centrifugó y el precipitado, formado por células inmaduras de médula ósea, se resuspendió en un medio enriquecido que favorece la diferenciación de estas células a macrófagos (Hosoe *et al.* 1989). Este medio está constituido por un 30% de sobrenadante procedente del cultivo de células L929 en DMEM 10% FBS y que se caracteriza por ser rico en M-CSF (Waheed *et al.* 1979). Las células se sembraron a una densidad de 10<sup>6</sup>/cm<sup>2</sup> y se mantuvieron en estas condiciones hasta que estuvieron completamente diferenciadas (7-8 días).

Antes de realizar el tratamiento (12 h. antes) se sustituyó el medio de diferenciación por DMEM 2% FBS para eliminar el M-CSF y sincronizar la división celular antes de aplicar los estímulos.

### **2.4 Cultivo de fibroblastos embrionarios murinos (MEFs)**

Los fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) procedentes de animales deficientes para p53 y p19Arf fueron cedidos generosamente por el Dr. Serrano (CNIO). Fueron cultivados en sus primeros 1° a 2° pases *in vitro* en medio DMEM al 10% de FBS. 12h antes de ser tratados con los distintos estímulos se sustituyó el medio por DMEM al 2% de FBS y se recogieron las células para la obtención de mRNA y extractos proteicos (apartados 2.7 y 2.9).

### **2.5 Medida de citoquinas en el medio de cultivo**

La producción de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos celulares fue cuantificada mediante el ensayo “*Bio-Plex cytokine assay*” siguiendo las instrucciones del proveedor (BioRad Laboratorios). Brevemente, la técnica se basa en la formación de un sándwich de anticuerpos en torno a las citoquinas que serán detectadas en un citómetro y cuya identificación y cuantificación se basa en la combinación de los parámetros color (anticuerpo específico unido a una perla de un color determinado) y fluorescencia (anticuerpo específico reconocido por estreptovidina-ficoeritrina).

### **2.6 Determinación de la síntesis de NO**

La liberación de NO (acumulación de nitritos) fue determinada empleando el método de Griess (Green *et al.* 1982; Hortelano *et al.* 1999). Este método se basa en la reacción de los nitritos con el ácido sulfanílico, originando una sal de diazonio que se une al naftiletilenodiamina (NEDA), dando un complejo diazo. Este complejo diazo genera una coloración rosa, más intensa según sea mayor la cantidad de nitritos en el medio. Se adicionó al medio de cultivo ácido sulfanílico 1mM en HCl 100mM y NEDA 1mM. La absorbancia se determinó a 548 nm y se interpolaron los valores obtenidos en la correspondiente curva patrón de NaNO<sub>2</sub>.

## **2.7 Cuantificación de RNA y PCR cuantitativa en tiempo real**

### **2.7.1 Aislamiento de RNA**

El RNA total fue aislado y purificado de células en cultivo y tejidos de los ratones que se lavaron en PBS frío y se homogenizaron con el reactivo “*TRIzol Reagent*” de Invitrogen (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. El homogenizado se transfirió a tubos de polipropileno de 1,5 ml. Una vez en los tubos, se añadió a cada muestra 200 µl de cloroformo frío y se agitaron vigorosamente durante 30 s. Posteriormente se mantuvieron 15 min a 4° C y se centrifugaron durante otros 15 min a 15700 x g a 4° C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml y se le añadió un volumen igual de isopropanol frío. A continuación las muestras se mantuvieron durante 1h a -80° C con el fin de precipitar el RNA. De nuevo se centrifugaron 15 min a 15700 x g y a 4° C, tras lo cual se decantó el sobrenadante dejando el precipitado de RNA en el fondo del tubo. Este se lavó varias veces con etanol frío al 75% y finalmente se resuspendió en agua ultrapura estéril, una vez el etanol se había evaporado por completo. Los RNAs extraídos se resolvieron en geles de 1,5% de agarosa para determinar la calidad de las moléculas de ácido nucleico visualizándolos en un transiluminador de UVA al teñir con bromuro de etidio (BrEt). Posteriormente se cuantificó la cantidad y la pureza de RNA usando un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies).

### **2.7.2 RT-PCR**

Por medio de una retrotranscriptasa inversa, el RNA total obtenido fue copiado a cDNA (DNA complementario). Este proceso se llevó a cabo utilizando los reactivos de Invitrogen (Life Technologies), concretamente el kit “*SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR*”. En todo momento se siguieron las recomendaciones del proveedor y la reacción se desarrolló en un termociclador Eppendorf<sup>R</sup>.

Se tomó 1 µg de RNA purificado y se le añadió 1µl de “*random hexamers*” (del inglés: cebadores de secuencia aleatoria) (50 ng/µl) y 1µl de cóctel de dNTPs (10 mM), llevando posteriormente cada muestra a un volumen final de 10 µl con agua estéril. Se incubaron los tubos durante 5 min a 65° C y posteriormente a 4° C durante 1 min. A continuación se añadió a cada tubo 10 µl del cóctel de síntesis de cDNA [2 µl de tampon RT 10x, 4 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µl DTT 0,1 M, 1µl RNaseOUT<sup>TM</sup> 40U/µl y 1 µl de la enzima

retrotranscriptasa SuperScript<sup>TM</sup> III (200 U/ $\mu$ l)]. Los tubos se agitaron y centrifugaron antes de incubarlos a 25° C durante 10 min y posteriormente a 50° C durante 50 min. Para detener la reacción se calentaron las muestras 5 min a 85° C y a continuación se enfriaron rápidamente en hielo. Finalmente, para eliminar posibles trazas de RNA se les añadió 1 $\mu$ l de RNAsa H a cada uno de los tubos y se mantuvieron a 37° C durante 20 min. Los cDNAs producto de esta secuencia de reacciones se conservaron a -20° C hasta su utilización.

### **2.7.3 PCR cuantitativa o en tiempo real (Q-PCR)**

El subsiguiente análisis de PCR cuantitativa se llevó a cabo usando SYBRgreen en el detector de secuencias Abiprism 7900HT de Applied Biosystem. Se emplearon reactivos de la misma casa comercial (placas ópticas de 96 pocillos, cubiertas adhesivas, cóctel “*Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix*”). Se siguieron las indicaciones de la casa comercial en todo momento y se emplearon las condiciones óptimas para cada pareja de cebadores. El SYBR Green es un agente intercalante fluorescente que se une al DNA de doble cadena (Bookout *et al.* 2003).

Para llevar a cabo los ensayos de Q-PCR se tomaron 2  $\mu$ l de cada mezcla de cDNA obtenida en la reacción de RT-PCR, se les añadieron 10  $\mu$ l del cóctel comercial SYBR<sup>®</sup> Green y 250 nM de cada uno de los cebadores “sentido” y “antisentido” para cada gen de interés, llevando posteriormente cada muestra a un volumen final de 20  $\mu$ l con agua ultrapura estéril. Para la normalización de los datos se empleó un gen correspondiente a una subunidad ribosómica cuya expresión no se ve modificada por los diversos tratamientos utilizados [36B4 o Arbp (acidic ribosomal phosphoprotein P0)]. En cada caso se realizaron duplicados tanto para los genes diana como para los controles endógenos o normalizadores de carga. Para cada gen calculamos y evaluamos la curva de disociación para confirmar que los iniciadores eran realmente específicos del gen diana y amplifican una única secuencia o amplicón. Las secuencias de los cebadores específicos utilizados para cada gen se muestran en la Tabla IV. Estas secuencias de los iniciadores de DNA o cebadores utilizados se diseñaron utilizando el programa informático Primer3 del [Broad Institute of MIT and Harvard](#), se corroboró la secuencia homóloga de hibridación de los cebadores fuesen únicas en el genoma murino mediante el uso de BLAST (Ensemble).

GEN	SENTIDO (5' → 3')	ANTISENTIDO (5' → 3')
IL-6	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
NOS II	GAGCTGGGCTGTACAAACCTT	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG
COX-2	GCTGTACAAGCAGTGGCAAAG	GCGTTTGCGGTACTIONATTGAGA
TLR2	TCTGACCCGCCCTTTAAGCT	CGATGGAATCGATGATGTTGTC
TLR4	AGAAATTCCTGCAGTGGGTCA	TCTCTACAGGTGTTGCACATGTCA
p21	CAGCGACCATGTCCAATCCT	CGAAGAGACAACGGCACACTT

**Tabla IV** Secuencia de oligonucleótidos utilizados en Q-PCR con muestras murinas.

El análisis de la reacción se realizó utilizando el programa informático SDS2.1 7900 mediante cuantificación relativa a la muestra tomada como control basal (siempre las muestras correspondientes a las células WT sin tratamiento (control) y normalizando la carga con el valor correspondiente del gen normalizador 36B4 (DNA ribosómico) y descartando aquellas muestras que presentasen más de 2 ciclos de variación respecto al mismo.

#### 2.7.4 *Microarray de DNA*

La expresión de los genes inflamatorios fue evaluada utilizando un *microarray* de expresión génica en placa de 96 pocillos “*Mouse RT<sup>2</sup>Profiler™ PCR Inflammatory Cytokines and Receptors Array*” de SABiosciences. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, como sigue, se aislaron 2 µg de RNA (con el uso del reactivo TRIzol) que se emplearon para la síntesis de cDNA con el RT2 First Strand Kit (SABiosciences). El cDNA resultante se hibridó en la placa “*Mouse RT<sup>2</sup>Profiler PCR Inflammatory Cytokines and Receptors Array*” usando el *Profiler PCR Array System* y el *SYBR Green/Fluorescein qPCR master mix* de SABiosciences siguiendo las instrucciones del proveedor. La reacción de PCR cuantitativa se llevó a cabo en el detector de secuencias ABI 7900HT. La expresión génica se comparó utilizando el programa *online* de PCR Array System (<http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). Este *software* realiza automáticamente todas las  $\Delta\Delta C_t$  basadas en la tasa de cambio a partir de los datos de

“*threshold*” o umbral de ciclo crudos cargados en el sistema provenientes de la reacción de PCR.

### 2.8 Preparación de extractos citosólico y nuclear.

La obtención de extractos proteicos de células en cultivo se llevó a cabo según una modificación del método de Schreiber (Schreiber *et al.* 1989), que permite hacer extractos a partir de un pequeño número de células.

Las células ( $3-6 \times 10^6$ ) se lavaron dos veces con PBS frío y se resuspendieron en 150  $\mu$ l de tampón A frío (HEPES 10mM pH 7,9, EDTA 1mM, EGTA 1mM, KCl 10 mM.) al que se añadió extemporalmente una combinación de inhibidores de proteasas de Sigma (AEBSF 104 mM, aprotinina 80  $\mu$ M, leupeptina 2 mM, bestatina 4 mM, pepstatina A 1,5 mM, E-64 1,4 mM) y Nonidet P-40 0,5%. Tras incubación en hielo durante 15min se agitó vigorosamente durante 10 s. El homogeneizado se centrifugó a 15700 x g a 4° C durante 5 min y el sobrenadante se fraccionó y se almacenó a -80° C (extracto citosólico).

El precipitado nuclear se resuspendió en 50  $\mu$ l de tampón C frío (HEPES pH 7,9 20 mM, NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, glicerol 20%) al que se añadió el cóctel de inhibidores mencionado previamente. Los tubos se agitaron suavemente a 4° C durante 30 min, posteriormente se centrifugó 15 min a 15700 x g a 4° C. El sobrenadante (extracto nuclear) se congeló a -80° C. Todos los pasos de extracción se realizaron a 4° C. La cantidad de proteína se cuantificó por el método de Bradford (ver 2.10).

### 2.9 Preparación de extracto total.

Para obtener el extracto total proteico, las células ( $3-6 \times 10^6$ ) en adhesión se lavaron con PBS y se resuspendieron en 200  $\mu$ l en tampón de extracto total (Chaps 0,5%, Tris 10 mM pH 7,5,  $Cl_2Mg$  1 mM, EGTA 1 mM, Glicerol 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM), en presencia el cóctel de inhibidores de proteasas de Sigma mencionado anteriormente. Tras 15 min de incubación se sometieron a agitación fuerte en aparato vórtex durante 5 min a 4° C y por último se centrifugaron a 15700 x g durante 15 min a 4° C. El sobrenadante se recuperó desechando el precipitado (restos de membranas celulares) y se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford descrito a continuación.



## **2.10 Determinación de la concentración de proteínas**

La determinación de la concentración de proteínas de los extractos se realizó según el método descrito por Bradford (Bradford 1976), usando BSA como patrón. Este método se basa en la reacción entre los grupos sulfonados ácidos presentes en el azul de Coomassie (azul brillante), por fuerza iónica, con grupos amino libres presentes en aminoácidos básicos, principalmente arginina, lisina e histidina de las proteínas. Los cambios de absorbancia a 595 nm son directamente proporcionales a la concentración de proteína presente.

## **2.11 Análisis de proteínas por Western-Blot**

### **2.11.1 Electroforesis y transferencia**

Las proteínas se separaron electroforéticamente en un gel SDS-poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida 29:1) a distintos porcentajes (15%-6%) según el tamaño molecular de la proteína diana, en condiciones desnaturizantes según el método descrito por Laemmli (Laemmli 1970). Los extractos de proteínas se calentaron a 95° C durante 10 min en el tampón de muestras Laemmli (Tris-HCl pH 6,8 60 mM, SDS 2%, glicerol 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 3% y azul de bromofenol 0,005%) cargándose en los geles cantidades iguales de proteína de cada muestra y mismo volumen. Los geles se sometieron a corriente eléctrica en cubetas de electroforesis “*Miniprotean 3*” de BioRad a temperatura ambiente.

Terminada la electroforesis, las proteínas se transfirieron por el sistema de transferencia húmeda a membranas de *Hybond<sup>TM</sup>-PVDF* (Amersham) en un medio de transferencia compuesto por Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%, pH 8,3.

### **2.11.2 Inmunodetección**

Con el fin de saturar o bloquear los sitios de unión inespecífica, las membranas se incubaron durante 1-2 h. en una solución de leche en polvo desnatada o BSA según se tratase de anticuerpos contra proteínas totales o proteínas fosforiladas respectivamente, al 5% en PBS en agitación suave a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo las membranas se incubaron con los anticuerpos específicos o primarios (ver 2.1. Reactivos), diluidos en leche o BSA al 5% en PBS-T (PBS y Tween-20 0,1% p/v), a la concentración de uso adecuada, durante toda la noche a 4° C en agitación suave. Transcurridas 16h, las

membranas fueron lavadas con PBS-T tres veces durante 15 min en agitación a temperatura ambiente. Tras el lavado las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (conjugado con peroxidasa de rábano picante). Antes de revelar las membranas fueron lavadas de nuevo con PBS-T tres veces durante 15 min para eliminar los restos de anticuerpos no unidos específicamente. Las membranas se revelaron empleando reactivos de ECL Lumigen™ TMA-6 de GE Healthcare y se obtuvieron imágenes digitales en el sistema óptico LAS-3000 de Fujifilm. Se realizaron siempre varias exposiciones de diferente duración de cada membrana. La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó mediante análisis digital de las imágenes obtenidas mediante el *software* Image Gauge v4.0 de Fujifilm. Los anticuerpos utilizados se describen en el apartado 1.1.

### **2.12 Extracción y preparación de tejidos y tinciones histoquímicas**

#### **2.12.1 Inclusión de tejidos por congelación y sección en criostato.**

Los tejidos de los ratones tratados (hígados y orejas) fueron recogidos directamente y congelados en reactivo OCT™ (Tissue Tek) que ayuda a mantener la estructura del tejido en nitrógeno líquido. Se hicieron cortes seriados de 8 µm con un criotomo (Leica CM1850) recogiéndose en portaobjetos polarizados. Fueron mantenidos a -20° C hasta su tinción.

#### **2.12.2 Inclusión de tejidos en parafina y sección en microtomo.**

Los tejidos (corazones y riñones) se extrajeron del animal y se embebieron en paraformaldehído (PFA) al 4% durante toda la noche. Al día siguiente se llevaron a un procesador de muestras (Leica ASP300) donde se deshidrataron en soluciones crecientes de etanol y finalmente en xilol. Una vez deshidratados se prepararon los bloques de parafina en una estación de parafina (Leica EG1150C) y posteriormente se realizaron cortes seriados de 7- 5 µm en microtomo (Leica RM2155) que se colocaron en portaobjetos polarizados para hacer las tinciones.

### **2.12.3 Tinción de cortes histológicos: Hematoxilina-Eosina (HE)**

Las muestras se fijaron a 60° C 20 min, en el caso de la parafina, y con PFA 4% 15 min en el caso de los tejidos criopresevados. Las muestras de parafina se aclararon en xilol y se rehidrataron en una serie de alcoholes de concentraciones decrecientes (Etanol Absoluto (Sigma), 95%, 70% y 50%, 5 min en cada uno) hasta hidratarse completamente en agua pura. A continuación se embebieron en hematoxilina de Gill (de color azul, de naturaleza básica se une a ácidos) durante 1 a 10 min según el tejido. Seguidamente se aclararon con agua corriente el tiempo suficiente para que esta dejase de arrastrar colorante. Posteriormente se embebieron los tejidos en eosina acética (de color rojo) durante 3 min Después se lavó en agua corriente durante unos segundos y se procedió a su deshidratación en una serie de concentraciones crecientes de etanol (50%, 70%, 95% y absoluto) durante 2 min en cada tipo de alcohol. Finalmente se introdujeron en xilol (Sigma) y se montaron en portaobjetos mediante el empleo de solución de montaje permanente DPX (Sigma). Se llevaron a un microscopio óptico (Nikon Eclipse 90i) y se tomaron imágenes con el objetivo de 20 aumentos.

### **2.13 Ensayo de unión al DNA del factor de transcripción NFκB (p65)**

Los macrófagos fueron estimulados con los tratamientos correspondientes y se prepararon los extractos nucleares como se describe previamente. La actividad de unión a DNA del factor de transcripción NFκB (p65) fue medida usando el kit de unión de NFκB (p65) de Rockland. Este ensayo se basa en la técnica de ELISA, con pequeñas modificaciones. Los distintos extractos nucleares se hibridan con el DNA de doble cadena que presenta una secuencia consenso de unión al factor de transcripción NFκB(p65) y que reviste el fondo de los pocillos de una placa de 96. Posteriormente, se lava la placa y se añade el anticuerpo anti-NFκB(p65) que se unirá a la proteína retenida específicamente por unión a DNA. Tras añadir el anticuerpo secundario unido a peroxidasa, se añade el sustrato de la enzima y posteriormente la solución de bloqueo de la reacción. Finalmente se mide por espectrofotometría a 450nm, siendo mayor la señal en aquellos pocillos correspondientes a las muestras en las que más se haya inducido la expresión de NFκB(p65) activo. Para asegurar la especificidad del ensayo se lleva siempre un control positivo compuesto por un extracto de células HeLa estimuladas con TNFα que expresan

grandes cantidades de NFκB(p65) activo así como distintos controles negativos donde deja de añadirse alguno de los reactivos utilizados.

### **2.14 Preparación de plásmidos.**

#### **2.14.1 Transformación de bacterias competentes.**

Para la amplificación de plásmidos se utilizaron bacterias “*Subcloning Efficiency*<sup>TM</sup> *DH5α*<sup>TM</sup> *Chemically Competente E.coli*” (Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies). Las bacterias se descongelaron en hielo y se tomó una alícuota de 100 μl en tubo de microcentrífuga para cada transformación. Se añadieron directamente 10 ng de DNA plasmídico a las bacterias y se mezclaron con agitación suave sin pipetear para no dañar a las células procariotas. Tras incubarlas en hielo durante 30 min se sometieron a un choque térmico a 37° C durante 1 min para permitir la entrada del DNA a través de la membrana procariota. Inmediatamente después los tubos se pusieron en hielo durante 5 min y tras este tiempo se añadió 1 ml de medio 2xYT (Tryptona 16g/l, NaCl 5 g/l y extracto de levadura 10g/l) sin antibiótico y se mezcló suavemente los tubos se incubaron en un baño a 37° C durante 1 h. De cada tubo de transformación se tomaron 200 μl y se sembraron en una placa de 2xYT-agar con antibiótico específico (para el cual el plásmido en cuestión aporta resistencia a las bacterias, ampicilina 100 μg/ml). Las placas se incubaron durante un periodo de 16 a 20 horas a 37° C.

#### **2.14.2 Crecimiento de bacterias transformadas y purificación de plásmidos.**

Transcurrido el tiempo necesario para el crecimiento de las colonias resistentes a antibiótico en las placas de agar, se seleccionó una única colonia y se inoculó con ella un tubo de 5 ml de 2xYT con antibiótico (ampicilina 100 μg/ml) y se dejó crecer en agitación en un incubador de bacterias a 37° C. Tras 6 h, el contenido total de este pre-inóculo se transfirió a un matraz de 250 ml de 2xYT-ampicilina y se incubó en agitación durante toda la noche a 37° C. Posteriormente el cultivo bacteriano resultante se centrifugó durante 5 min a 5000 rpm en centrífuga Sorvall RC. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se sometió a los reactivos del “*Kit Genomed Jet Star*” para la extracción de plásmidos siguiendo las indicaciones del proveedor. La característica principal de este tipo de kits es la ausencia de CsCl<sub>2</sub> y el empleo de columnas de alta afinidad por el DNA plasmídico. El

DNA obtenido por lavado de la columna, se lavó con etanol y se resuspendió en agua ultrapura estéril. La concentración de DNA se determinó por cuantificación en el espectrofotómetro NanoDrop 1000. Las alícuotas resultantes se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  y fueron utilizadas para los ensayos de transfección.

### 2.15 Transfección de macrófagos

Los macrófagos peritoneales fueron transfectados transitoriamente con los vectores de expresión de “*cDNA pCMV-SPORT mouse TRP53*” de Open Biosystems o “*pLPC mouse p19ARF*” (cedidas por el Dr. Serrano) junto con un vector de expresión de “*cDNA pBABE GFP*” para cuantificar el porcentaje de transfección por microscopía de fluorescencia. Debido a los bajos índices de transfección que se obtienen por métodos convencionales en líneas primarias y especialmente células fagocíticas, como los macrófagos, para llevar a cabo la transfección se empleó el “*mouse Macrophages Nucleofector Kit*” que suministra Lonza en el aparato de nucleofección de AMAXA siguiendo las instrucciones del proveedor. Los macrófagos peritoneales se obtuvieron como hemos descrito previamente y se transfectaron antes de sembrarse en platos de cultivo. Brevemente, se resuspendieron  $1 \times 10^6$  células en 100  $\mu\text{l}$  de *Mouse Macrophage Nucleofector Solution* junto con el DNA de interés (un total de 2  $\mu\text{g}$ ). La mezcla se llevó a las cubetas específicas del nucleofector de AMAXA y se sometió a las condiciones particulares de corriente eléctrica y tiempo recomendados para macrófagos. Tras la aplicación del campo eléctrico que permite que las moléculas de DNA atraviesen las membranas las células se resuspendieron en medio RPMI con FBS al 20% y se mantuvieron en cultivo durante 24-36 h antes de observar expresión de GFP.

### 2.16 Transfección de vectores en células HEK293T

Células HEK293T (línea celular humana embrionaria de riñón) se sembraron en medio DMEM sin suero y se transfectaron transitoriamente con los vectores de expresión “*pLPC mouse p19ARF*” y “*pLPC Mouse p16INK4A*” (cedidos generosamente por el Dr. Manuel Serrano) con el reactivo “jetPEI” de Polyplus Transfection siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Tras 48h tras la transfección del DNA las células se recogieron y se extrajo la proteína en extractos totales como se detalla en el apartado 2.8.

### 2.17 Análisis por citometría de flujo de las poblaciones leucocitarias

El recuento de leucocitos totales en el lavado peritoneal se realizó por citometría de flujo y con la ayuda del sistema de “*Cytocounts number-calibrated microbeads*” de Dako, estas fluoroesferas de poliestireno de 5,2  $\mu\text{m}$  sirven como población de referencia para el recuento de una población de interés de leucocitos. El análisis de las distintas poblaciones leucocitarias se realizó por citometría de flujo tras teñir con anti-F4/80 y anti-Gr-1, para detectar células de las líneas monocitos/macrófagos y neutrófilos/granulocitos respectivamente. Previamente se eliminaron los eritrocitos con el reactivo de ruptura DakoCytomation EasyLyse<sup>TM</sup>. Los linfocitos fueron identificados por exclusión citométrica de tamaño/complejidad. Los eventos fueron registrados usando un FACScan de BD Biosciences.

### 2.18 Detección de marcadores de superficie mediante citometría de flujo.

Se incubaron  $10^5$  células de origen mieloide con los anticuerpos primarios (ver apartado 2.1, Tabla I: Citometría) a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  en 80  $\mu\text{l}$  de medio DMEM durante 30 min a 4° C. Tras 2 lavados en DMEM, las células fueron incubadas durante 30 min con 50  $\mu\text{l}$  del anticuerpo secundario correspondiente conjugado con marcador fluorescente (Sigma). Las células fueron lavadas y se añadió yoduro de propidio (0,001% p/v) para identificar y descartar las células muertas por marcaje positivo. Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson) incluyéndose los controles negativos apropiados para cada isotipo de anticuerpos utilizados para establecer los adecuados *gates* o regiones de adquisición y análisis. Los datos adquiridos se analizaron con el programa informático “Summit Cytomation v.3.1”.

### 2.19 Ensayos de adhesión

#### 2.19.1 Adhesión estática

- **Adhesión celular a proteínas de matriz extracelular.**

Los sustratos (fibronectina 10 $\mu\text{g/ml}$ , colágeno 40  $\mu\text{g/ml}$ , vitronectina 2,5  $\mu\text{g/ml}$  y BSA 1% p/v inactivada por calor) se incubaron en placas ópticas de 96 pocillos durante

toda la noche a 4° C, 40 µl /pocillo. Los sitios inespecíficos de unión se bloquearon a la mañana siguiente incubando con BSA 1% (inactivada por calor) durante 90 min a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS, se añadieron los macrófagos peritoneales (100.000 células /pocillo/100 µl) de animales WT y KO. Se dejaron 10 min a 4° C para permitir que todas las células alcanzasen el fondo del pocillo y posteriormente se incubaron 30 min a 37° C en incubador. Tras este periodo se lavó 2 veces con PBS (37° C) y se fijó durante 10 min con PFA 3% en PBS (50 µl/pocillo) a temperatura ambiente. Se aspiró el PFA y se añadió 2% de metanol durante 2 min para permeabilizar las células. Posteriormente se tiñó con cristal violeta en metanol al 20% 1 min 30 seg. Se desechó el exceso de tinción con agua y posteriormente se lavó con solución desteñidora (0,1 M Citrato Sódico pH 4,2 en Etanol al 50%). La adhesión celular se cuantificó por técnicas de espectrofotometría (espectrofotómetro multi-placa Benchmark Plus microplate spectrophotometer Bio-Rad) midiéndose la absorbancia a 550 nm. del producto solubilizado en la solución de ácido cítrico-metanol. Igualmente se evaluó la adhesión por microscopía óptica (Nikon Eclipse TS100).

- **Co-adhesión celular macrófago-endotelio**

Básicamente se siguió el protocolo descrito por Hortelano et al 2010. Las células MLEC (Mouse Lung Endothelial Cells, células inmortalizadas obtenidas de vasos sanguíneos de pulmón de ratón C57/BL6), cedidas amablemente por el Dr. Alfonso Luque, fueron sembradas en monocapa en placas de 96 pocillos. Se estimularon con TNF- $\alpha$  (PeproTech) 20 µg/ml durante 6 horas. Tras este tiempo de activación la capa endotelial fue lavada con PBS varias veces y se añadieron los macrófagos peritoneales de animales WT y KO preteñidos 20 min con el marcador fluorescente CFSE 10µM (Molecular Probes Inc, C1157). Se añadieron 100.000 macrófagos por pocillo y se dejó que alcanzasen el fondo de la placa durante 10 min a 4° C y posteriormente que se adhiriesen a las células endoteliales durante 20 min en el incubador a 37° C. Transcurrido este tiempo, se lavaron dos veces con PBS a 37° C y se tomaron varias imágenes en un microscopio óptico (Nikon Eclipse TS100). Para cuantificar el número de macrófagos que permanecieron adheridos a la monocapa de células endoteliales, se trató con 100 µl/pocillo de solución de lisis (100mM Tris pH 8,8; 1% SDS) y se midió la fluorescencia a 485nm excitación/ 535nm emisión en un espectrofluorómetro de placa Fluoroskan Ascent, Thermo Labsystems.

### **2.19.2 En flujo**

Básicamente se siguió el protocolo descrito en Barreiro *et al.* 2005. Los macrófagos peritoneales ( $10^6$  células/ml) se hicieron pasar a través de una monocapa de células endoteliales confluentes MLEC activadas con TNF $\alpha$  ((PeproTech) 20  $\mu$ g/ml) en un flujo de 1,8 dyn/cm<sup>2</sup> durante 10 min. El “*rolling*” o rodamiento de los macrófagos se visualizó gracias a la reducción de velocidad que muestran las células que se van adheriendo respecto a las que fluyen libremente finalmente se consideró adheridas a las células que mantuvieron un contacto estable con la monocapa endotelial por al menos 20 seg. El número de células adherentes se cuantificó por visualización directa de 6 campos diferentes (en el objetivo de contraste de fases) durante 30 seg. cada uno desde el minuto 3,5 hasta el 6,5 de la perfusión.

### **2.20 Análisis de sangre periférica**

#### **2.20.1 Recuento de poblaciones celulares sanguíneas (Hemograma)**

La sangre de ratón fue extraída del plexo venoso retro-orbital en tubos de polipropileno que contenían el anticoagulante EDTA (1mg/ml sangre) como anti-coagulante. El recuento sanguíneo fue determinado empleando el contador hematológico automático Abacus Junior Vet.

#### **2.20.2 Extracción de plasma sanguíneo**

El plasma para los análisis bioquímicos se obtuvo centrifugando la sangre extraída a 2000 xg durante 10 min a 4° C. El precipitado celular se desechó y el plasma fue congelado a -80° C hasta su análisis para las siguientes determinaciones biométricas.

- **Cuantificación de citoquinas en plasma**

Los sobrenadantes se utilizaron para cuantificar TNF $\alpha$  e IL-6 mediante la técnica de ELISA, utilizando los kits de R&D Systems siguiendo las instrucciones del proveedor.



- **Análisis de actividades enzimáticas**

La sangre se procesó como en el apartado anterior y se cuantificaron las actividades aspartato aminotransferasa (AST) y alanino aminotransferasa (ALT) en un analizador de bioquímica (Spinlab 100 de la casa comercial Spinreact).

### **2.21 Peritonitis inducida con tioglicolato**

Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) con 2,5 ml de tioglicolato estéril al 3% peso/volumen (Den Otter *et al.* 1982; Segal *et al.* 2002; Zeini *et al.* 2006). El exudado peritoneal se recogió a distintos tiempos después de la aplicación del estímulo con PBS frío.

### **2.22 Edema en oreja de ratón y actividad mieloperoxidasa (MPO)**

Se siguió la técnica descrita previamente por Young (Young *et al.* 1983) y Recio (Recio *et al.* 1994). El proceso inflamatorio se inició mediante la aplicación de 2,5 µg de TPA disueltos en 20µl de acetona, aplicándose 10µl en la zona interna y otros 10 µl en la zona externa de la oreja derecha de animales de 20-25 g. En la oreja izquierda se aplicaron los mismos volúmenes de vehículo (acetona). Los animales fueron sacrificados a las 4h por inhalación de CO<sub>2</sub>. Secciones idénticas de ambas orejas fueron seccionadas con un sacabocados y pesadas en balanza de precisión. El incremento de peso de la oreja derecha respecto a la izquierda indica la formación de edema.

#### **2.22.1 Determinación de la actividad MPO en oreja.**

Las secciones de oreja se homogenizaron en 750µl de suero salino y tras centrifugación a 15700xg durante 15 min a 4° C se determinó la actividad MPO en alícuotas de los sobrenadantes mediante una modificación del método de Suzuki (Suzuki *et al.* 1983) descrito por Navarro (Navarro *et al.* 1997). A 50 µl del sobrenadante, se le añadieron 150 µl de PBS, 20 µl de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,22M (pH 5,4), 20 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,026 % (v/v) y 20 µl de tetrametilbenzidina (18mM en dimetilformamida acuosa al 8% (v/v)). Tras 10 min de reacción a 37° C, se añadieron 30 µl de acetato sódico 1,46 M (pH 3,0) y se midió la absorbancia a 620 nm usando un espectrofotómetro multi-placa Benchmark Plus microplate spectrophotometer de Bio-Rad.

### **2.23 Choque endotóxico inducido por LPS**

Los ratones de 11-12 semanas se agruparon en lotes de 7-8 animales y se les inyectó intraperitonealmente 10 mg/Kg de LPS de *E. coli* serotipo B5:055 de Sigma. La supervivencia fue monitorizada cada 4 horas durante 6 días. La sangre se recogió del plexo venoso retro-orbital a las 2 y 6h de la inyección i.p. Los animales destinados a análisis tisular se sacrificaron a las 48h, extrayéndose los órganos para su posterior análisis histológico.

### **2.24 Análisis estadístico**

Los datos corresponden a la media aritmética +/- la desviación estándar con un n = 3 ó mayor. La significancia estadística fue estimada mediante el test *t* de Student para eventos independientes usando el programa Prism 5 (GraphPad Software). Los valores de \*p < 0,05 o \*\*p < 0,001, se consideran significativos.

*Resultados*

---

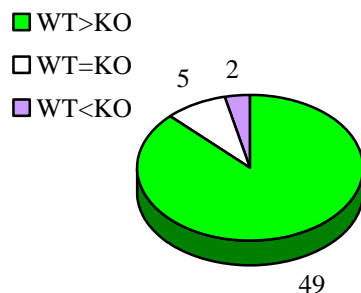


# 1 LA AUSENCIA DE p19ARF PROVOCA LA DISMINUCIÓN DE LAS CITOQUINAS INFLAMATORIAS EN RESPUESTA A LIGANDOS DE LOS TLR

## 1.1 Respuesta a TLR4

Los macrófagos representan uno de los principales componentes celulares de la respuesta inflamatoria. Estos guardianes del sistema inmunitario innato, una vez activados, por ejemplo en respuesta a patógenos o sus componentes celulares como el LPS producen citoquinas clásicamente proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ), la interleuquina (IL)-1 $\beta$  y la IL-6, que son fundamentales en la fase de iniciación y mantenimiento de la inflamación (Nathan 2002).

Para determinar si p19ARF desempeña un papel relevante en el proceso inflamatorio, obtuvimos macrófagos peritoneales de animales WT y animales KO y los tratamos con LPS de *E.coli*, libre de endotoxinas durante 4 horas. De estas células extrajimos el RNA, sintetizamos el cDNA y realizamos un *microarray* de baja densidad “*RT<sup>2</sup> PCR array*” de 84 genes relacionados con inflamación (Ver “Materiales y métodos”). De los 84 genes analizados, 56 de ellos presentaban un aumento de expresión igual o superior a 2 en los macrófagos WT tratados con LPS respecto a la condición control (sin tratar) y se consideraron “genes regulados positivamente por LPS” (Figura 1 y Tabla 1). Al analizar la expresión de los genes inflamatorios en los macrófagos KO tratados con LPS, observamos que 49 de los 56 genes presentaban un menor nivel de expresión en los macrófagos KO que en los WT, entre ellos, genes clásicamente pro-inflamatorios como TNF $\alpha$  o IL-1 $\beta$  (Tabla 1 y Figura 1) y 5 genes se hallaban expresados en niveles semejantes. Por otro lado, los macrófagos de los animales p19Arf $^{-/-}$ , al contrario que los macrófagos WT, mostraron una clara regulación positiva de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (datos que fueron confirmados mediante Q-PCR (Figura 2 y Tabla 1)) y los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de la IL-10 además de la IL-13.



**Figura 1. Resumen del análisis de expresión del *microarray* de DNA RT<sup>2</sup> PCR.** Los macrófagos peritoneales de ratones WT y KO para p19ARF, fueron estimulados con LPS 200ng/ml durante 4 h y la expresión de genes inflamatorios fue analizada mediante *microarray* RT<sup>2</sup> PCR. En la figura se muestra la diferente distribución entre macrófagos WT y KO, de los 56 genes que mostraron cambios tras la estimulación con LPS, en verde se muestran aquellos que están menos expresados en las células KO que en las WT, en blanco los que se expresan de forma similar y en malva aquellos que están sobre-expresados en los animales KO. Se indica la cantidad de genes en cada grupo.

		PCR <i>Microarray</i> #:				Macrófagos WT LPS	Macrófagos KO LPS
LPS +		GeneBank	Simbolo	Descripción	Nombre del gen	Inducción	Inducción
	1	NM_013854	Abcf1	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	AU041969/Abc50	1,51	1,26
	2	NM_009744	Bcl6	B-cell leukemia/lymphoma 6	Bcl5	0,97	-3,79
1	3	NM_007551	Blr1	Burkitt lymphoma receptor 1	CXC-R5/CXCR-5	4,89	-4,01
2	4	NM_009778	C3	Complement component 3	AI255234/ASP	18,32	14,30
3	5	NM_009807	Casp1	Caspase 1	ICE/II1bc	4,57	3,81
4	6	NM_011329	Ccl1	Chemokine (C-C motif) ligand 1	BF534335/I-309	6,06	1,13
5	7	NM_011330	Ccl11	Small chemokine (C-C motif) ligand 11	Scya11/eotaxin	16,36	-1,73
6	8	NM_011331	Ccl12	Chemokine (C-C motif) ligand 12	MCP-5/Scya12	197,17	137,93
7	9	NM_011332	Ccl17	Chemokine (C-C motif) ligand 17	ABCD-2/Scya17	267,60	268,78
8	10	NM_011888	Ccl19	Chemokine (C-C motif) ligand 19	CKb11/ELC	3,88	-3,32
9	11	NM_011333	Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	AI323594/HC11	97,44	75,25
10	12	NM_016960	Ccl20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	CKb4/LARC	8,45	9,10
11	13	NM_009137	Ccl22	Chemokine (C-C motif) ligand 22	ABCD-1/DCBCK	995,19	346,04
12	14	NM_019577	Ccl24	Chemokine (C-C motif) ligand 24	CKb-6/MPIF-2	49,27	23,28
	15	NM_009138	Ccl25	Chemokine (C-C motif) ligand 25	AI852536/CKb15	1,12	-4,10

13	16	NM_011337	Ccl3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	AI323804/G0S19-1	188,73	96,80
14	17	NM_013652	Ccl4	Chemokine (C-C motif) ligand 4	Act-2/MIP-1B	128,34	65,27
15	18	NM_013653	Ccl5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	MuRantes/RANTES	679,71	211,02
	19	NM_009139	Ccl6	Chemokine (C-C motif) ligand 6	MRP-1/Scya6	0,42	-1,71
16	20	NM_013654	Ccl7	Chemokine (C-C motif) ligand 7	MCP-3/Scya7	167,46	36,82
17	21	NM_021443	Ccl8	Chemokine (C-C motif) ligand 8	1810063B20Rik/ AB023418	23,12	10,09
18	22	NM_011338	Ccl9	Chemokine (C-C motif) ligand 9	CCF18/MRP-2	7,39	4,90
	23	NM_009912	Ccr1	Chemokine (C-C motif) receptor 1	Cmkbr1/Mip-1a-R	1,65	1,67
	24	NM_009915	Ccr2	Chemokine (C-C motif) receptor 2	CC-CKR-2/CCR2A	0,08	-7,86
	25	NM_009914	Ccr3	Chemokine (C-C motif) receptor 3	CC-CKR3/CKR3	0,56	-1,26
19	26	NM_009916	Ccr4	Chemokine (C-C motif) receptor 4	Cmkbr4/LESTR	4,52	-4,67
	27	NM_009917	Ccr5	Chemokine (C-C motif) receptor 5	AM4-7/CD195	0,54	-1,61
20	28	NM_009835	Ccr6	Chemokine (C-C motif) receptor 6	Cmkbr6	7,52	-6,83
21	29	NM_007719	Ccr7	Chemokine (C-C motif) receptor 7	CD197/Cdw197	13,69	1,78
22	30	NM_007720	Ccr8	Chemokine (C-C motif) receptor 8	Cmkbr8/mCCR8	5,31	-2,34
23	31	NM_009913	Ccr9	Chemokine (C-C motif) receptor 9	Cmkbr10/GPR-9-6	3,54	1,05
24	32	NM_007768	Crp	C-reactive protein, pentraxin-related	AI255847	8,88	-3,66
25	33	NM_009142	Cx3cl1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	AB030188/ABCD-3	63,37	48,71
26	34	NM_008176	Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Fsp/Gro1	1094,73	1233,83
27	35	NM_021274	Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	C7/CRG-2	723,72	417,29
28	36	NM_019494	Cxcl11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	CXC11/H174	16,18	2,50
	37	NM_021704	Cxcl12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	AI174028/PBSF	0,93	-2,65
29	38	NM_018866	Cxcl13	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13	ANGIE2/Angie	13,07	-15,59
30	39	NM_011339	Cxcl15	Chemokine (C-X-C motif) ligand 15	Scyb15/lungkine	73,83	-4,00
31	40	NM_019932	Cxcl4	Chemokine (C-X-C motif) ligand 4	Pf4/Scyb4	3,84	21,63
32	41	NM_009141	Cxcl5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	AMCF-II/ENA-78	63,53	35,92
33	42	NM_008599	Cxcl9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	BB139920/CMK	237,30	161,06
	43	NM_009910	Cxcr3	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3	Cd183/Cmkar3	0,31	-3,29
	44	XM_894898	Ccr10	Chemokine (C-C motif) receptor 10	Cmkbr9/Gpr2	0,24	-9,39
34	45	NM_008337	Ifng	Interferon gamma	IFN-g/IFN-gamma	5,74	-2,39
	46	NM_010548	Il10	Interleukin 10	CSIF/Il-10	0,63	14,89
	47	NM_008348	Il10ra	Interleukin 10 receptor, alpha	AW553859/CDw210	0,92	7,46
	48	NM_008349	Il10rb	Interleukin 10 receptor, beta	6620401D04Rik/ AI528744	0,71	2,11
35	49	NM_008350	Il11	Interleukin 11	IL-11	9,10	-6,46
	50	NM_008355	Il13	Interleukin 13	Il-13	0,57	16,34
36	51	NM_133990	Il13ra1	Interleukin 13 receptor, alpha 1	AI882074/CD213a1	2,82	3,08
37	52	NM_008357	Il15	Interleukin 15	AI503618	9,96	5,92
	53	NM_010551	Il16	Interleukin 16	mKIAA4048	0,05	-34,05
38	54	NM_019508	Il17b	Interleukin 17B	1110006O16Rik/ 1700006N07Rik	6,71	-6,55
39	55	NM_008360	Il18	Interleukin 18	Igif/Il-18	8,53	9,31

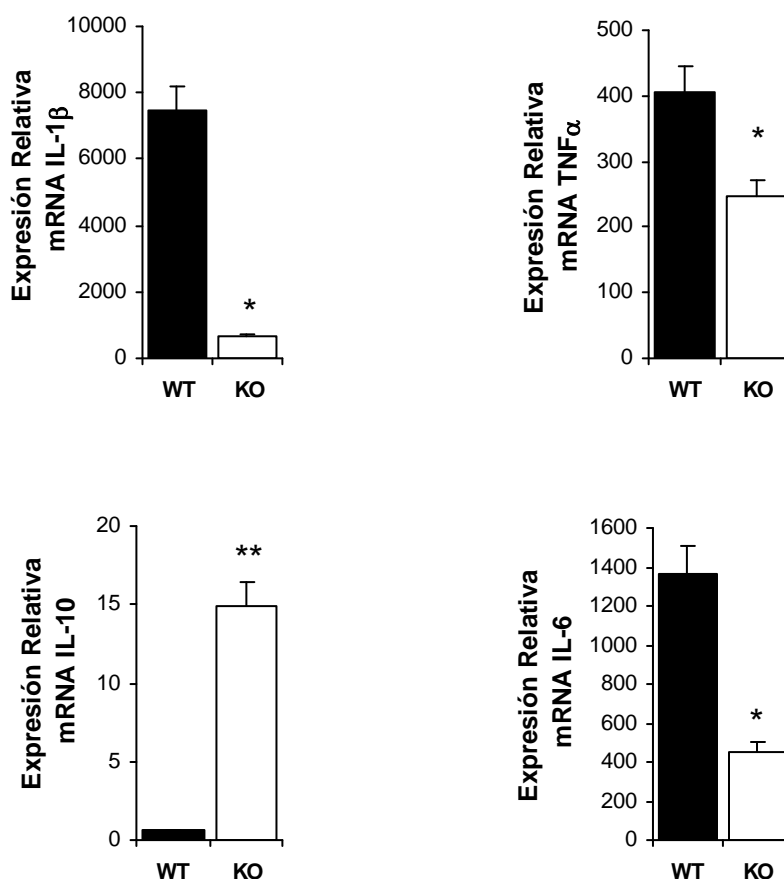
## Resultados

+0	56	NM_010554	Il1a	Interleukin 1 alpha	Il-1a	1167,70	714,42
+1	57	NM_008361	Il1b	Interleukin 1 beta	IL-1beta/Il-1b	7459,00	651,65
+2	58	NM_019450	Il1f6	Interleukin 1 family, member 6	Fil1/IL-1H1	8,64	-4,50
+3	59	XM_130058	Il1f8	Interleukin 1 family, member 8	2310043N20Rik	4,02	-4,24
	60	NM_008362	Il1r1	Interleukin 1 receptor, type I	CD121a/CD121b	1,15	-2,47
+4	61	NM_010555	Il1r2	Interleukin 1 receptor, type II	CD121b/Il1r-2	4,09	-4,01
+5	62	NM_021380	Il20	Interleukin 20	Zcyto10	10,54	1,06
	63	NM_008368	Il2rb	Interleukin 2 receptor, beta chain	CD122/IL-15Rbeta	1,99	-3,11
+6	64	NM_013563	Il2rg	Interleukin 2 receptor, gamma chain	CD132/[g]c	3,15	1,83
+7	65	NM_010556	Il3	Interleukin 3	BPA/Csfmu	4,44	-2,83
	66	NM_021283	Il4	Interleukin 4	IgG1/Il-4	0,77	-29,63
+8	67	NM_008370	Il5ra	Interleukin 5 receptor, alpha	CD125/CDw125	8,73	-2,92
	68	NM_010559	Il6ra	Interleukin 6 receptor, alpha	CD126/IL-6R	0,02	-31,72
	69	NM_010560	Il6st	Interleukin 6 signal transducer	5133400A03Rik/ AA389424	0,51	-7,02
+9	70	NM_009909	Il8rb	Interleukin 8 receptor, beta	CD128/CDw128	4,44	-14,81
	71	NM_008401	Itgam	Integrin alpha M	CD11b/CD18	0,68	-1,06
	72	NM_008404	Itgb2	Integrin beta 2	2E6/AI528527	0,78	-1,28
50	73	NM_010735	Lta	Lymphotoxin A	LT/LT-[a]	17,26	9,88
	74	NM_008518	Ltb	Lymphotoxin B	AI662801/LTbeta	1,75	1,93
	75	NM_010798	Mif	Macrophage migration inhibitory factor	GIF/Glif	1,23	1,29
	76	NM_007926	Scye1	Small inducible cytokine subfamily E, member 1	9830137A06Rik/ AIMP1	0,58	-1,06
51	77	NM_009263	Spp1	Secreted phosphoprotein 1	AA960535/AI790405	6,81	7,66
	78	NM_011577	Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1	TGF-beta1/Tgfb	0,81	-1,92
52	79	NM_013693	Tnf	Tumor necrosis factor	DIF/TNF-alpha	405,28	247,67
53	80	NM_011609	Tnfrsf1a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	CD120a/FPF	2,05	-1,11
54	81	NM_011610	Tnfrsf1b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	CD120b/TNF-R-II	6,98	3,24
55	82	NM_011616	Cd40lg	CD40 ligand	CD154/Cd40I	4,67	-9,28
	83	NM_023764	Tollip	Toll interacting protein	4930403G24Rik/ 4931428G15Rik	0,68	-1,02
56	84	NM_011798	Xcr1	Chemokine (C motif) receptor 1	Ccxc1/GPR5	6,66	-1,24

**Tabla 1. Lista de los 84 genes analizados en el microarray de DNA RT2 PCR.** Los macrófagos peritoneales de ratones WT y ARF<sup>-/-</sup> fueron estimulados con LPS 200ng/ml durante 4 h y la expresión de genes inflamatorios fue analizada mediante *microarray* de DNA RT<sup>2</sup> PCR. La tasa de expresión relativa se calculó respecto a la condición WT sin tratamiento de LPS (=1). En rojo se muestran los niveles de activación superior a 2 veces y en azul los niveles de represión inferior a -2. En negro, las variaciones consideradas no significativas, entre -2 y +2. En la primera columna se han numerado solo aquellos genes que mostraron variaciones significativas por el tratamiento en animales WT, se muestran con fondo verde los genes que se activan más en WT que en KO tras tratamiento con LPS y en blanco los que muestran niveles semejantes. En fondo malva se indican los genes que se inducen en KO (en WT no muestran un nivel significativo de inducción). Los resultados muestran la media de 2 muestras independientes para cada condición.



Para corroborar la cuantificación de los niveles de inducción del mRNA de las citoquinas pro-inflamatorias más importantes realizamos ensayos de Q-PCR, analizando algunos de los genes recogidos en el microarray (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-10) (Figura 2). Los niveles de expresión de estas citoquinas fueron mucho menores en los animales KO que en los animales WT tras tratamiento con LPS, excepto para la IL-10 que aumentó su expresión notablemente en los macrófagos KO permaneciendo indetectable en las células WT. Además analizamos también otra importante citoquina pro-inflamatoria de macrófagos, la IL-6. Como se muestra en la Figura 2B el tratamiento con LPS indujo el mismo efecto observado para otras citoquinas pro-inflamatorias, mostrando los macrófagos procedentes de animales KO menor expresión de IL-6 que los de WT.

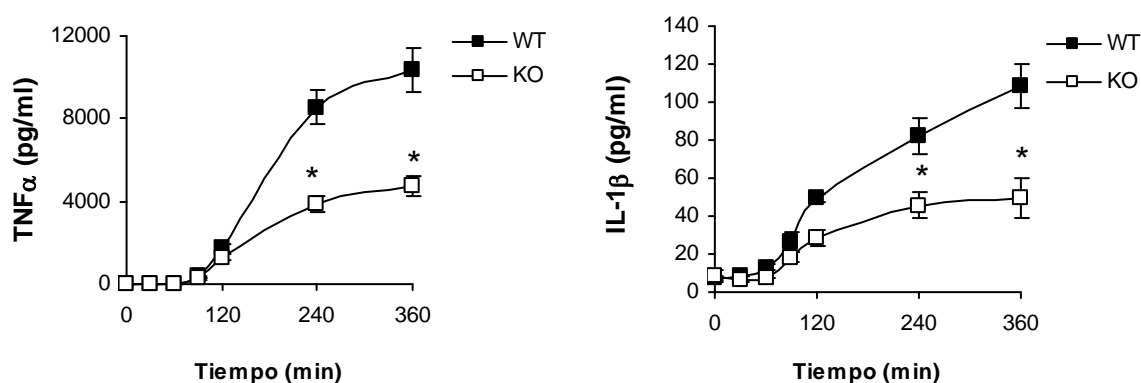


**Figura 2 Nivel de expresión relativa de citoquinas.** Los macrófagos peritoneales de animales WT y deficientes para p19Arf fueron activados durante 4 h con 200 ng/ml de LPS cuantificándose los niveles de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-10 e IL-6 por Q-PCR. Los resultados fueron obtenidos de tres experimentos independientes realizados por triplicado y los datos muestran la media  $\pm$  D.E. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  con respecto a los ratones WT.

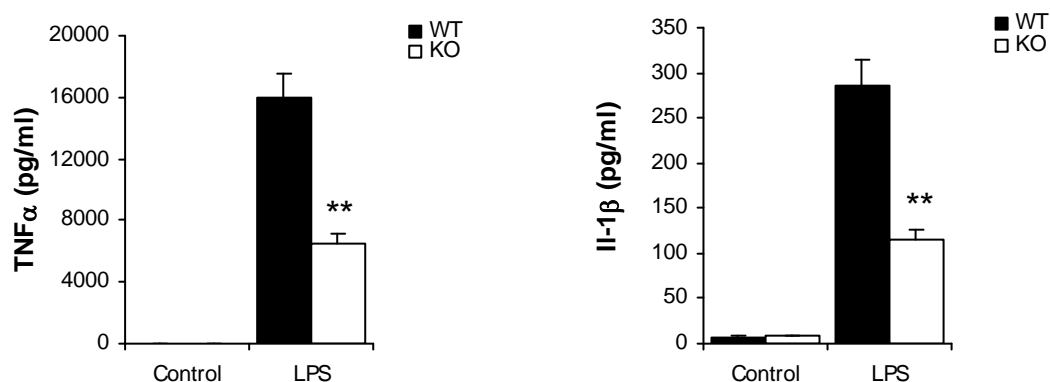
## Resultados

Para comprobar si los efectos observados a nivel transcripcional, se correspondían también con cambios en la expresión de las proteínas, analizamos los niveles TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  liberados al medio de cultivo de macrófagos peritoneales tratados con LPS durante varios tiempos. Los resultados confirmaron la situación mostrada por los datos de regulación transcripcional (Q-PCR y *microarray*), ya que la liberación de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta al tratamiento con LPS estaba notablemente reducida en los macrófagos peritoneales de los p19Arf $^{-/-}$  respecto a los ratones WT (Figura 3).

A

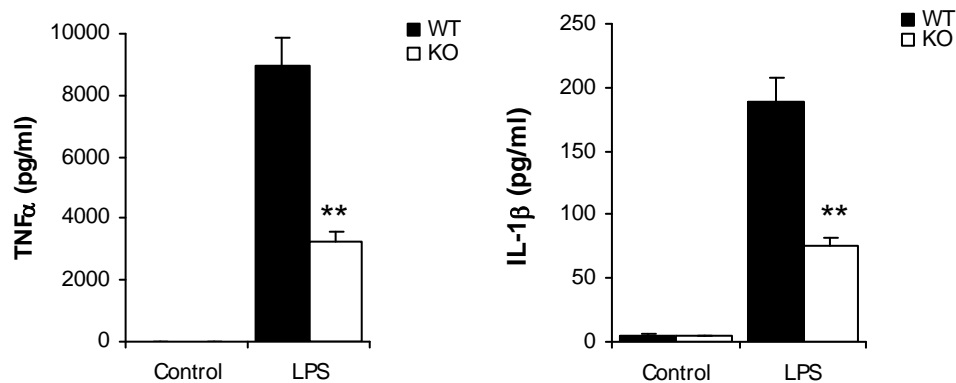


B



**Figura 3 Niveles de citoquinas secretadas por macrófagos tras la activación de TLR4** A) Los macrófagos peritoneales de ratones p19Arf $^{-/-}$  y WT se estimularon con LPS (200ng/ml) durante distintos tiempos o B) durante 24h. Los niveles de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se midieron en los sobrenadantes mediante citometría de flujo con el sistema de “Bio-Plex cytokine assay”. Los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes realizados por triplicado y se expresan como la media de los datos  $\pm$  D.E. \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  con respecto a los ratones WT.

Para comprobar si este efecto era exclusivo de macrófagos peritoneales o por el contrario existían más poblaciones de la línea macrofágica que estaban afectadas en estos ratones, realizamos la medida de liberación de citoquinas pro-inflamatorias a 24 horas tras tratamiento con LPS en macrófagos derivados de médula ósea (BMDM). Los resultados mostraron el mismo efecto que en el caso de los macrófagos peritoneales (Figura 4).

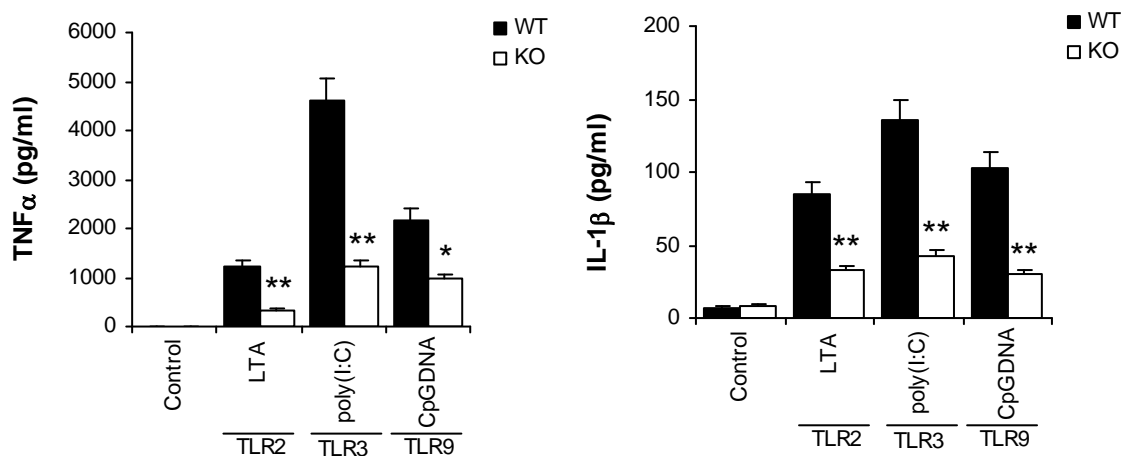


**Figura 4 Niveles de citoquinas en macrófagos derivados de médula ósea tras activación de TLR4.** Los BMDM de ratones p19Arf  $-/-$  y WT fueron estimulados con LPS 200ng/ml durante 24 h. La concentración de citoquinas en el sobrenadante de los cultivos fue medida con “Bio-Plex cytokine assay”. Los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes realizados por triplicado y se expresan como la media de los datos  $\pm$  D.E. \*\*  $p < 0,01$  con respecto a los ratones WT.

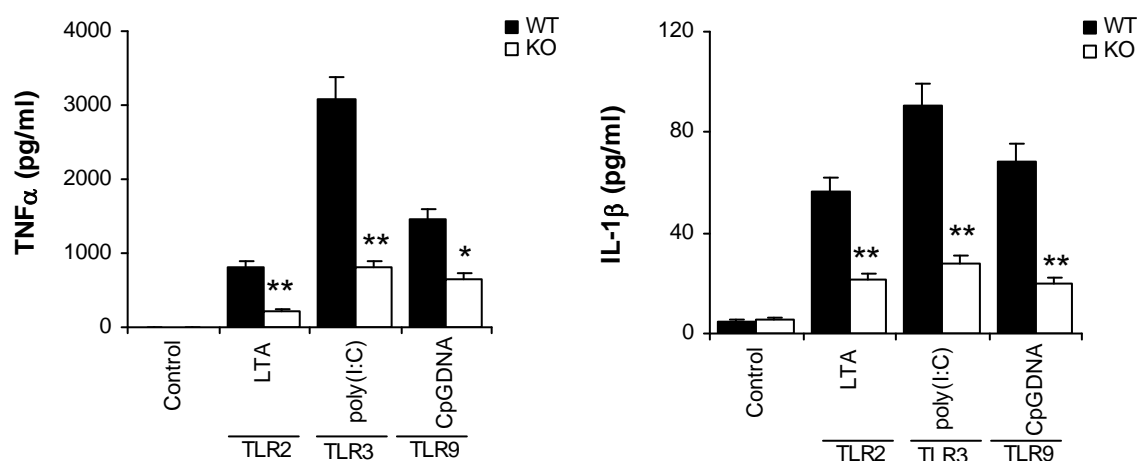
## 1.2 Respuesta a otros TLR

Para profundizar en el papel de p19ARF en la activación de los TLR, examinamos la producción de citoquinas mediada por otros TLR además del TLR4 (LPS). Para ello tratamos tanto macrófagos peritoneales (Figura 5A) como macrófagos derivados de médula ósea (Figura 5B) durante 24 horas con diferentes ligandos de los TLR: de TLR2 (LTA), TLR3 (poly I:C) y TLR9 (CpG). Tal y como ya habíamos visto en el caso del TLR4, observamos una menor capacidad de las células KO para expresar citoquinas pro-inflamatorias, lo que indicaba que ARF podría desempeñar un papel importante en la respuesta inflamatoria mediada por la mayoría de los TLR.

A



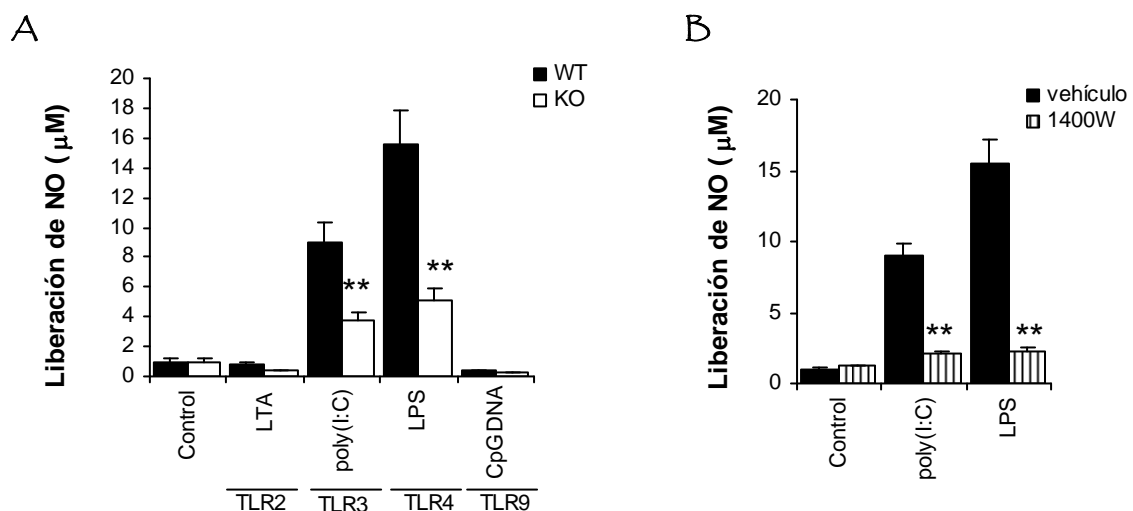
B



**Figura 5 Niveles de citoquinas secretadas por macrófagos peritoneales tras activación de otros TLR. A)** Los macrófagos peritoneales de animales WT y p19Arf<sup>-/-</sup> fueron estimulados con distintos ligandos de TLR, 10 µg/ml LTA (TLR2), 30 µg/ml poly(I:C) (TLR3) y 8 µg/ml CpG-ODN (TLR9) durante 24 h. **B)** Los BMDM de animales p19Arf<sup>-/-</sup> y WT fueron estimulados de igual manera que en A. La concentración de citoquinas TNF-α e IL-1β fue medida en el sobrenadante de los cultivos con “Bio-Plex cytokine assay”. Los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes realizados por triplicado y se expresan como la media de los datos ± D.E. \*p < 0,05 y \*\* p < 0,01 con respecto a los ratones WT.

## 2 EL DÉFICIT DE p19ARF AFECTA A LA LIBERACIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS

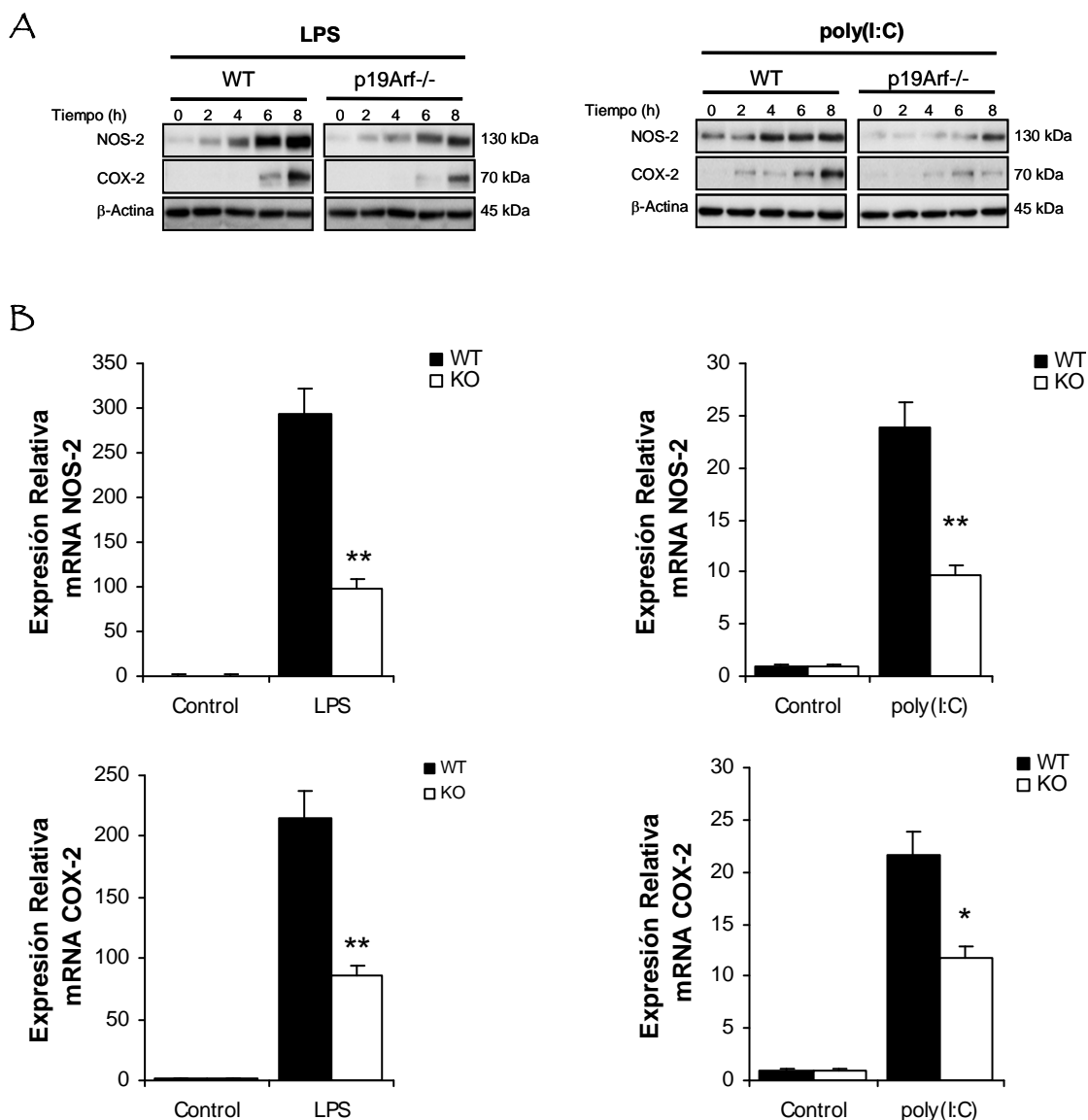
Junto con las citoquinas, otros mediadores inflamatorios como el NO (óxido nítrico) y las PGs (prostaglandinas) son moléculas de señalización en la cascada inflamatoria. La producción de NO y PGs está mediada por las enzimas NOS-2 y COX-2 respectivamente. Estas enzimas llamadas “inducibles”, no se transcriben de forma notable en condiciones basales, sin embargo en respuesta a estímulos inflamatorios se activan factores de transcripción (principalmente NFκB y AP-1) que inducirán su expresión y consecuentemente el aumento de sus productos de reacción, NO y PGs, respectivamente. Con el objetivo de comprobar si los macrófagos peritoneales activados, procedentes de animales p19Arf<sup>-/-</sup>, podían tener también afectada la producción del mediador inflamatorio NO cuantificamos la liberación de este gas al medio de cultivo tras activación con distintos ligandos de TLR. Efectivamente, los animales KO para p19Arf mostraron una clara disminución de la producción de NO respecto a los de ratones WT (Figura 6A). Para comprobar que la liberación de NO observada, dependía exclusivamente de la activación de NOS-2, empleamos el inhibidor específico de esta enzima, el compuesto sintético 1400W. Tal y como podemos observar en la Figura 6B, el tratamiento con 1400W inhibió completamente la liberación de NO inducida por LPS o poly(I:C).



**Figura 6 Cuantificación de la producción de NO.** **A)** La liberación de NO en macrófagos peritoneales se determinó mediante la reacción de Griess tras estimulación durante 24 h con los distintos ligandos (10 µg/ml LTA (TLR2), 30 µg/ml poly(I:C) (TLR3), 200 ng/ml LPS (TLR4) y 8 µg/ml CpG-ODN (TLR9)). **B)** A modo de control los macrófagos peritoneales procedentes de ratones WT fueron estimulados con 200 ng/ml de LPS y 30 µg/ml de poly(I:C) durante 24 h, en presencia o ausencia de 100 µM del inhibidor de NOS-2, 1400W, y la liberación de NO fue determinada mediante la reacción de Griess. Los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes realizados por triplicado y se expresan como la media de los datos ± D.E. \*\* p < 0,01 con respecto a los ratones WT.

## Resultados

De acuerdo con los niveles de producción de NO específica de NOS-2, la síntesis de esta proteína también se vio disminuida como pudimos observar mediante *western-blot* (Figura 7). Este efecto también se observó en la expresión de la enzima inflamatoria inducible, COX-2 (Figura 7A). De acuerdo con el tipo de regulación de estos dos genes, el análisis de Q-PCR reveló que la inducción de NOS-2 y COX-2 estaba inhibida a nivel transcripcional (Figura 7B).



**Figura 7 Nivel de expresión de las enzimas inflamatorias NOS-2 y COX-2.** A) Los macrófagos peritoneales fueron estimulados a varios tiempos con 200 ng/ml de LPS y con 30 µg/ml de poly(I:C) y se evaluaron los niveles de expresión de las proteínas inducibles NOS-2 y COX-2 mediante WB. La imagen es un *western-blot* (WB) representativo de tres experimentos distintos. B) Los macrófagos peritoneales de animales WT y deficientes para p19Arf fueron activados durante 4 h con 200 ng/ml de LPS y 30 µg/ml de poly(I:C) y se cuantificaron los niveles de NOS-2 y COX-2 por Q-PCR. Los resultados fueron obtenidos de tres experimentos independientes realizados por triplicado y los datos muestran la media ± D.E. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  con respecto a los ratones WT.

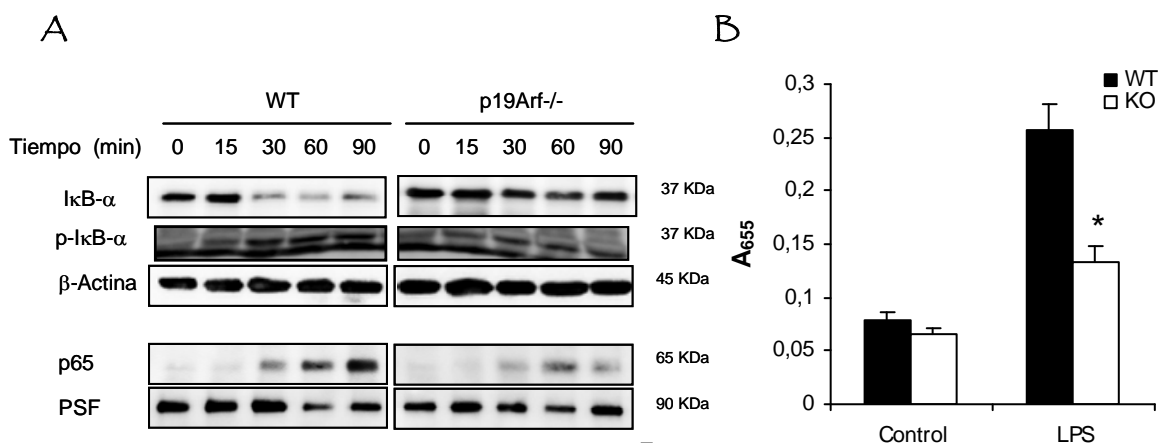
Todos estos resultados nos indican que la presencia de p19ARF es necesaria para una correcta activación de los genes inducidos tras la estimulación de los receptores TLR. Por eso cabe suponer que la activación de los principales factores de transcripción implicados en esta respuesta podrían estar también alterados en ausencia de ARF.

### **3 LA AUSENCIA DE p19ARF DISMINUYE LA ACTIVACIÓN NFκB Y LAS MAPK EN MACRÓFAGOS ESTIMULADOS CON LPS**

La cascada intracelular que se desencadena por activación de los TLR tras la unión a sus ligandos culmina con la activación de varias citoquinas inflamatorias y otros mediadores inflamatorios como IL-6, NOS-2 y COX-2. Los datos mostrados hasta el momento confieren a ARF un papel crucial en la adecuada regulación de la expresión de dichos mediadores y en consecuencia en la activación de las señales puestas en marcha tras la activación de los TLR.

Se sabe que estos genes contienen en sus promotores sitios de unión para NFκB al igual que para otros factores de transcripción que son activados por las MAPK (ERK, JNK y p38), por lo tanto nos propusimos explorar el efecto de p19ARF en estas vías de señalización.

Como en los ensayos anteriores, para estudiar la vía de NFκB, tratamos a los macrófagos peritoneales con 200 ng/ml de LPS, en este caso durante tiempos cortos (15, 30, 60 y 90 minutos). Analizamos la translocación al núcleo de RelA ó p65, el principal miembro de la familia de NFκB relacionado con respuesta inflamatoria en macrófagos (Figura 8A), así como su capacidad de unión al DNA (Figura 8B). Los resultados obtenidos en estos experimentos mostraron que la actividad de NFκB en los animales KO estaba sensiblemente disminuida respecto a los macrófagos WT.

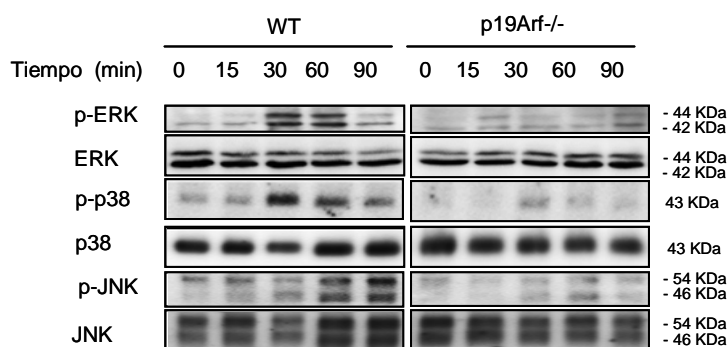


**Figura 8. Señalización a través de la vía de NFκB.** **A)** Los macrófagos peritoneales de animales WT y p19Arf<sup>-/-</sup> se estimularon con 200 ng/ml de LPS durante los tiempos indicados. Posteriormente se obtuvieron extractos citosólicos y nucleares y se analizaron por WB con los siguientes anticuerpos *anti-IκBα*, *anti-NFκB p65*, *anti-β-actina* (normalizador de carga para citosol) y *anti-PSF* (normalizador de carga para núcleo). Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos independientes. **B)** Ensayo de unión a DNA en extractos nucleares de macrófagos peritoneales procedentes de ratones p19Arf<sup>-/-</sup> y WT que fueron estimulados con 200 ng/ml de LPS durante 1 h. Los resultados muestran la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos analizados por triplicado. \* $p < 0,05$  con respecto a los ratones WT.

En concordancia con los resultados anteriores, observamos que los niveles de degradación de IκBα, el inhibidor del dímero p65/p50, eran sensiblemente menores en los KO de p19Arf que en los WT (Figura 8A). El efecto en la fosforilación de IκBα (señal post-traduccional que marca a este inhibidor para ser degradado) no fue tan marcado, pero también estaba reducido en los macrófagos KO. Por tanto, este efecto sobre IκBα podría explicar al menos en parte la inhibición observada en la activación de p65.

No solo la vía de NFκB se veía disminuida en los KO sino que también la vía de las MAPK estaba afectada (Figura 9), ya que los niveles de fosforilación de ERK, p38 y JNK, que indican el grado de activación de estas quinasas, fueron mucho menores en las muestras correspondientes a los macrófagos p19Arf<sup>-/-</sup>. El defecto en la activación de estas vías de señalización en los animales deficientes para p19Arf explicaría la disminución observada previamente en la expresión de sus moléculas diana, las citoquinas y enzimas pro-inflamatorias.





**Figura 9. Señalización a través de la vía de MAPK.** Los macrófagos peritoneales de animales WT y p19Arf<sup>-/-</sup> se estimularon con 200 ng/ml de LPS durante los tiempos indicados. Posteriormente se obtuvieron extractos citosólicos y nucleares y se analizaron por WB con los siguientes anticuerpos *anti-p38*, *anti-JNK-SAPK*, *anti-ERK p44/42*, *anti-phospho-p38*, *anti-phospho-JNK-SAPK*, *anti-phospho-ERK p44/p42*. Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos independientes.

Todos estos datos nos permiten afirmar que p19ARF ejerce un papel importante en la activación de NFκB y la señalización a través de las MAPK por activación de TLR4.

## 4 LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS TLR EN LOS RATONES p19Arf<sup>-/-</sup> ESTÁ ALTERADA

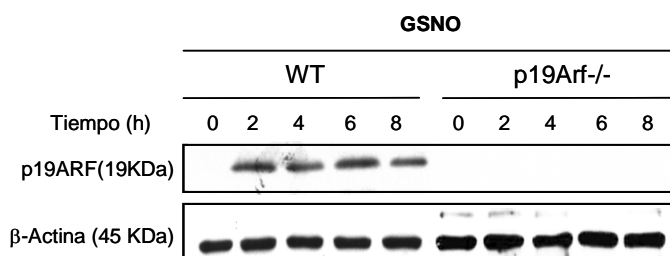
### 4.1 Regulación de la expresión del locus *Ink4a*

Teniendo en cuenta todos estos resultados previos era necesario averiguar si la expresión de p19ARF estaba afectada por la activación de los TLR. En condiciones basales, el locus *Ink4a/Arf* se expresa a niveles muy bajos y solo es posible detectar la expresión de p19ARF en ratones de edad avanzada (Palmero *et al.* 1997; Zindy *et al.* 1997; Zindy *et al.* 1998) o tras tratamiento con estímulos pro-apoptóticos tales como donadores de NO tal y como habíamos podido demostrar previamente en nuestro grupo (Zeini *et al.* 2007) utilizando los mismos animales con los que desarrollamos el actual trabajo (Figura 10). Según se muestra en la Figura 11A, en este caso tampoco fuimos capaces de detectar la proteína en condiciones basales, lo que corroboraba los datos de la literatura donde ya se había descrito que p19ARF no se expresa en las células madre hematopoyéticas recién

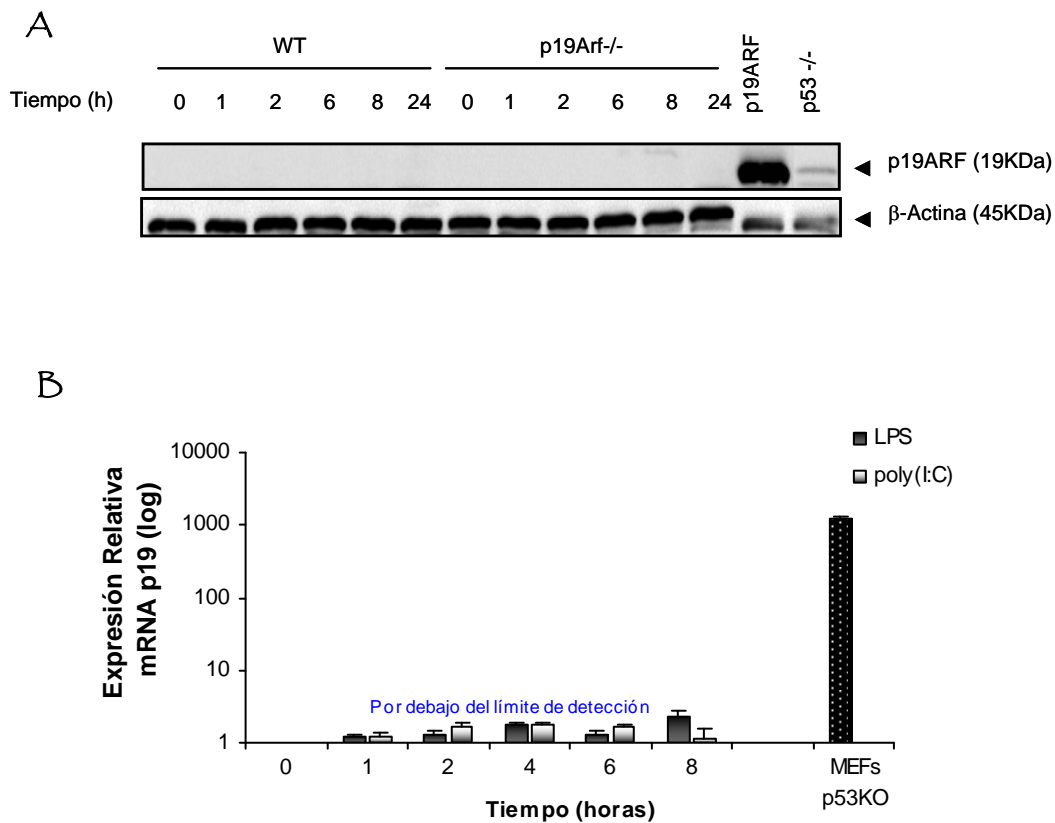
## Resultados

extraídas [solo lo hace tras 10 ó 12 días en cultivo y solo en el 12-20% de las células (Stepanova *et al.* 2005) y en nuestras condiciones no se mantuvieron nunca en cultivo más de 7 u 8 días hasta la aplicación del tratamiento]. Como se muestra en la Figura 11A la estimulación con LPS no provocó inducción de la expresión de la proteína de p19ARF permaneciendo indetectable tanto en las células sin tratar como en las tratadas con el ligando, en esta figura se muestran, a modo de controles positivos, la expresión de la proteína p19ARF en MEF deficientes para p53 y su expresión exógena en células HEK293. De estos datos deducimos que en estas condiciones, el tratamiento con LPS no es capaz de inducir una liberación de NO suficientemente intensa como para activar la expresión de la proteína como sí había visto nuestro grupo en modelos de apoptosis con donadores de NO (Zeini *et al.* 2006) (ver Figura 10).

Sin embargo, para asegurarnos completamente de que la expresión del gen p19Arf no estaba regulada por LPS, empleamos la técnica de Q-PCR para detectar los niveles de mRNA de p19ARF. Como se muestra en la Figura 11B la expresión del mRNA de p19ARF no se vio regulada por el LPS o el poly(I:C), y siempre se mantuvo bajo niveles mínimos de expresión, de hecho, permanentemente por debajo del límite de detección (como en la condición basal) (lo que coincide con datos no publicados de chips de DNA que se pueden consultar en Gene Expression Omnibus, números GDS1249 y GDS2047, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Para asegurar la especificidad de la técnica y comparar los niveles de expresión utilizamos mRNA de células deficientes en p53 [que sobre-expresan p19ARF al carecer de la represión ejercida por este factor de transcripción en el promotor de p19ARF (Robertson *et al.* 1998; Stott *et al.* 1998)]. Esta falta de inducción se observó tanto macrófagos peritoneales (Figura 11B) como en BMDM (datos no mostrados) tratados con LPS y poly(I:C) (Figura 11B).

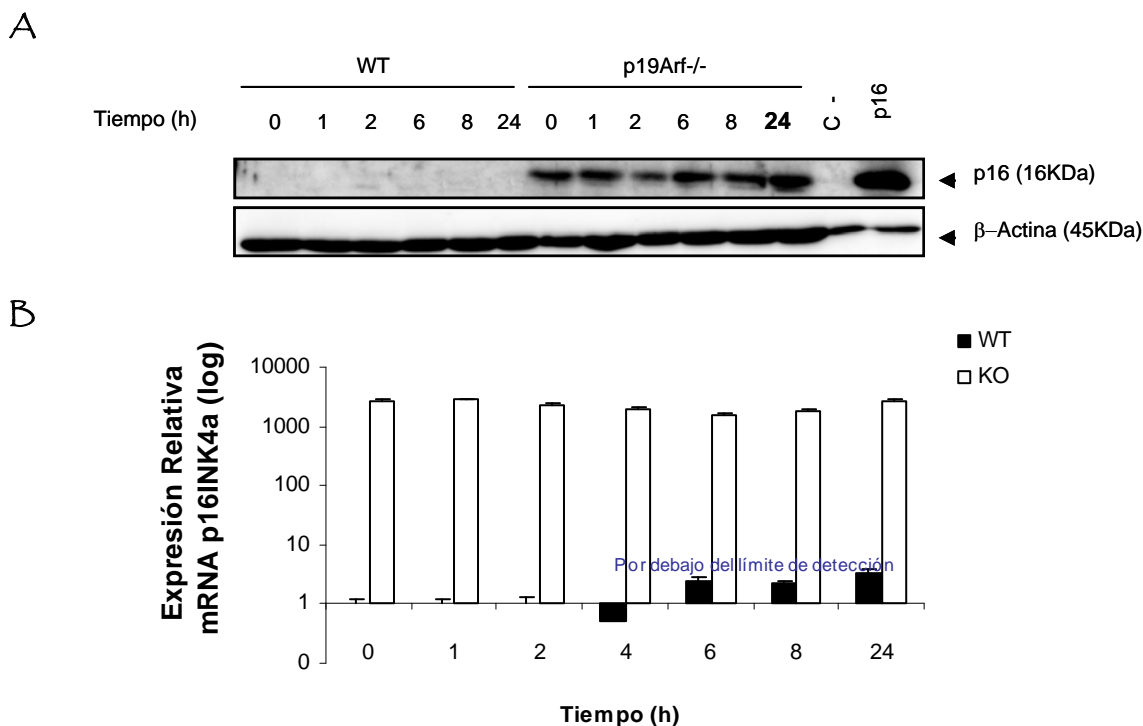


**Figura 10. Inducción de p19ARF por el donador de NO, GSNO.** Los fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) procedentes de animales WT y p19Arf <sup>-/-</sup> se incubaron con GSNO (500 μM) durante los tiempos indicados y se detectó la proteína de p19ARF mediante WB. Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos independientes.



**Figura 11. Niveles de expresión de p19ARF tras tratamientos con LPS y Poly (I:C).** **A).** Los niveles de proteína se determinaron mediante WB en macrófagos peritoneales tratados con 200 ng/ml LPS a los tiempos indicados; “p19ARF” representa células HEK293 transfectadas con el vector de expresión de p19ARF, p53<sup>-/-</sup> representa a MEFs deficientes para p53. Se muestra un gel representativo de tres experimentos. **B)** Los niveles de mRNA de p19ARF (escala logarítmica) fueron medidos por Q-PCR en macrófagos peritoneales WT tratados con 200 ng/ml de LPS y 30 µg/ml de poly(I:C) a los tiempos indicados y en MEF deficientes para p53 en condiciones basales. Los resultados fueron obtenidos de tres experimentos independientes realizados por triplicado y los datos muestran la media ± D.E.

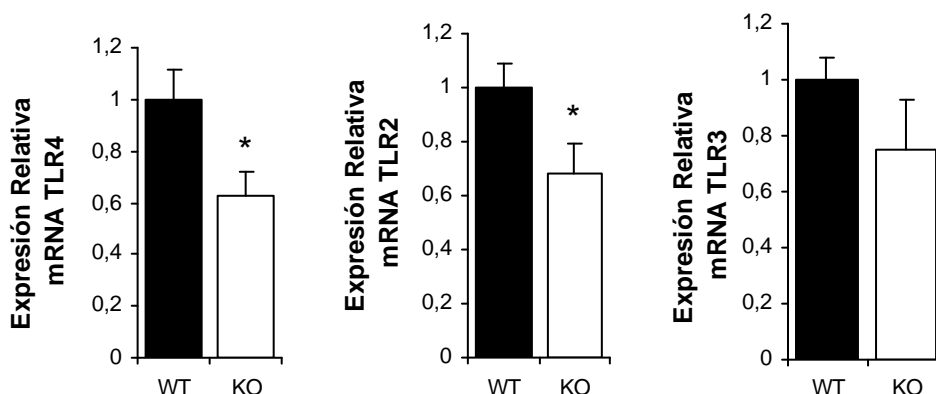
Se ha descrito (Kamijo *et al.* 1997 y Randle *et al.* 2001) que la delección del exón 1β del locus *Ink4a/Arf* provoca de alguna manera la desregulación de la transcripción de p16INK4A y como consecuencia, esta se sobre-expresa en los animales deficientes para p19Arf. A pesar de este aumento en p16INK4A, la ausencia de p19Arf no se asoció con ningún efecto modulador claro en los niveles basales del mRNA o la proteína de p16INK4A tras la estimulación con LPS (Figura 12A y B) o poly(I:C) (dato no mostrado). Estos resultados sugieren que la disminución de la activación de la respuesta inflamatoria en los ratones p19Arf<sup>-/-</sup> no se debe a la regulación del locus *Ink4a/Arf* por los ligandos de los TLR.



**Figura 12. Niveles de expresión de p16INK4A tras tratamiento inflamatorio.** **A)** Los niveles de proteína se determinaron mediante WB en extractos totales de macrófagos peritoneales tratados con 200 ng/ml LPS a los tiempos indicados; “p16” representa un control positivo de células HEK293 transfectadas con el vector de expresión de p16INK4a, “C-” representa células HEK293 sin transfectar. Se muestra un gel representativo de tres experimentos independientes. **B).** Los macrófagos peritoneales de ratones WT y p19Arf KO fueron tratados con 200ng/ml de LPS durante diferentes tiempos y los niveles del mRNA de p16INK4A (en escala logarítmica) fueron determinados por Q-PCR. Los datos muestran la media de tres experimentos  $\pm$  D.E. y normalizados respecto al WT tiempo 0.

## 4.2 Regulación de la expresión de los TLR

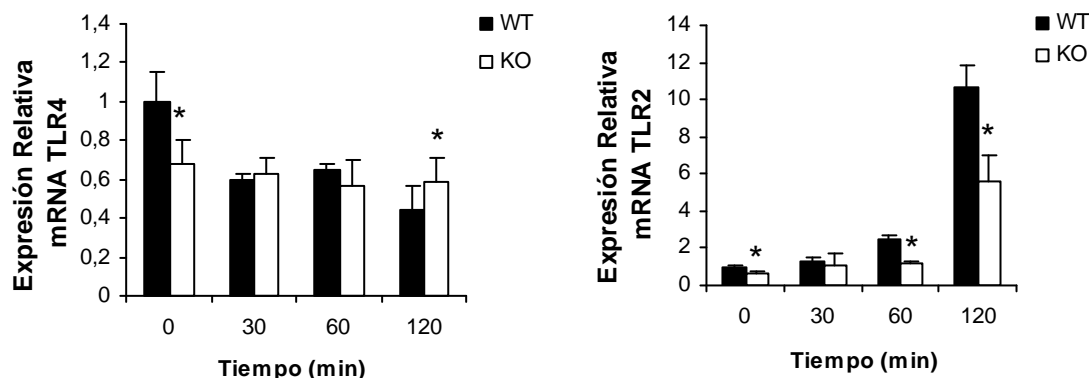
Otra posibilidad que debíamos contemplar era si la proteína p19ARF era capaz de regular la expresión de los receptores TLR lo que podría explicar, al menos en parte, el defecto en la respuesta inflamatoria que muestran los macrófagos KO. Para ello analizamos los niveles de expresión basal del mRNA de TLR2, TLR3 y TLR4 en macrófagos peritoneales de animales WT y KO. Como podemos observar en la Figura 13 los niveles basales de TLR2 y TLR4 se mostraron significativamente reducidos en los macrófagos peritoneales de los animales p19Arf<sup>-/-</sup>. En el caso de TLR3, aunque observamos también disminución, los datos no fueron estadísticamente significativos (Figura 13). Por otro lado, el nivel de expresión en BMDM fue muy similar al presentado por macrófagos peritoneales (datos no mostrados).



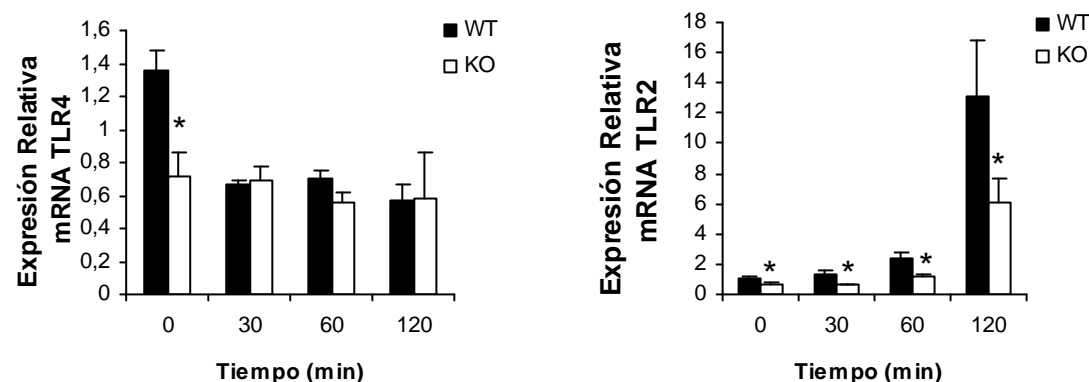
**Figura 13. Expresión basal de TLR.** Expresión basal de TLR2, TLR3 y TLR4 en macrófagos peritoneales WT y p19Arf<sup>-/-</sup> mediante Q-PCR. Los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes realizados por triplicado y se expresan como la media de las medidas  $\pm$  D.E. \* $p < 0,05$  con respecto a los ratones WT.

Partiendo de esta diferencia en condiciones basales entre animales WT y KO decidimos comprobar si existía también algún defecto en la regulación de estos receptores por efecto de ligando. Corroborando los datos existentes en la literatura (Poltorak *et al.* 1998; Matsuguchi *et al.* 2000; Nomura *et al.* 2000) la estimulación con LPS redujo transitoriamente la expresión del mRNA de TLR4 en los macrófagos y BMDM de animales WT, sin embargo los animales p19Arf<sup>-/-</sup> mostraron un comportamiento prácticamente insensible al LPS (Figura 14A y B). De forma similar TLR2, cuya expresión aumenta por efecto de su unión al ligando (Matsuguchi *et al.* 2000), no fue capaz de regularse de modo eficaz en los macrófagos y BMDM KO respecto a los WT cuando fueron tratados con LPS (Figura 14A y B).

A

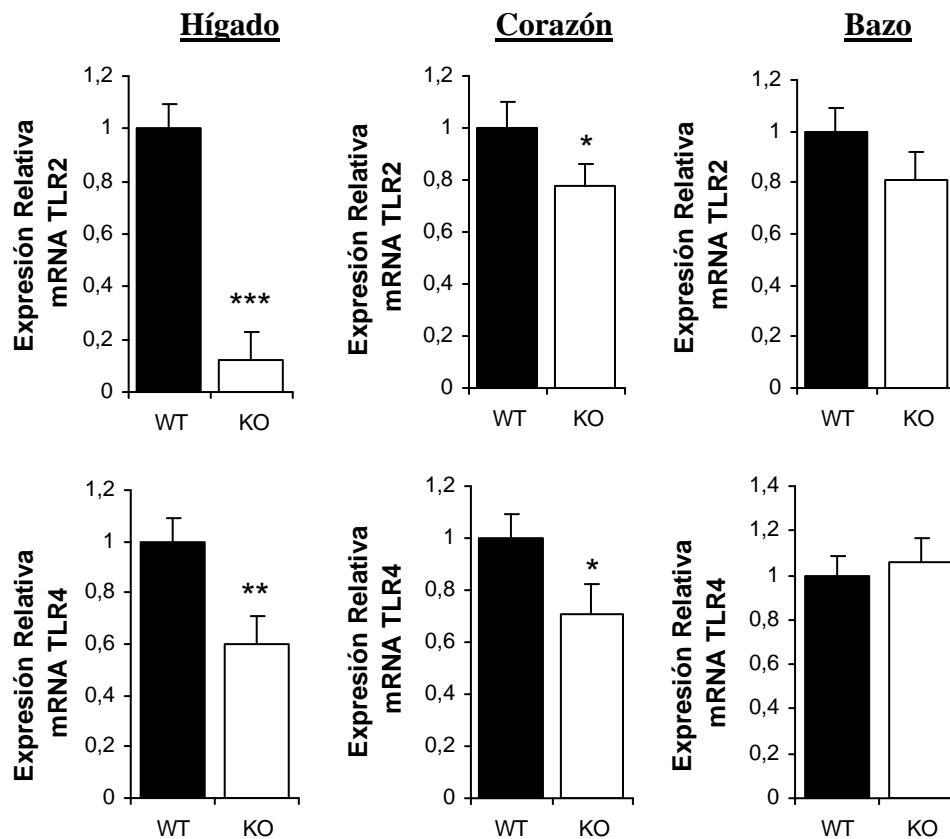


B



**Figura 14. Modulación de la expresión de TLR en macrófagos tratados con LPS.** Los macrófagos peritoneales en **A** y los BMDM en **B**, de animales WT y p19Arf<sup>-/-</sup> fueron estimulados con 200 ng/ml de LPS a los tiempos indicados y se determinó la expresión de mRNA de TLR2 y TLR4 mediante Q-PCR. Los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes realizados por triplicado y se expresan como la media de las medidas  $\pm$  D.E. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  con respecto a los ratones WT.

De forma análoga a los datos obtenidos *in vitro* en macrófagos peritoneales y de médula ósea en condiciones basales, el análisis de varios tejidos relacionados con la respuesta inmunitaria innata mostró defectos de expresión del mRNA de TLR2 y TLR4 en los animales p19ARF KO (Figura 15). Sin embargo, el bazo no presentó una diferencia significativa en la expresión de receptores TLR (Figura 15). Este resultado muestra por tanto que la participación de p19ARF en la expresión basal de los receptores TLR es dependiente del contexto tisular y que probablemente se asocie preferentemente a órganos hematopoyéticos más relacionados con línea mieloide.



**Figura 15. Expresión de TLR en tejidos.** La expresión de TLR2 y TLR4 fue analizada por PCR cuantitativa a partir de RNA mensajero aislado de hígado, corazón y bazo de ratones WT y p19Arf<sup>-/-</sup>. Los datos muestran la media  $\pm$  D.E. (n = 4) \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 y \*\*\*p < 0,001 con respecto a los ratones WT.

De todos estos resultados podemos inferir que la presencia de p19ARF regula de alguna manera, hasta ahora desconocida, los niveles de los TLR, tanto en condiciones basales como en respuesta a estímulo y que parece tratarse de una regulación específica de determinados tejidos. Sin duda estos resultados aportan nueva información a la, por ahora poco conocida, regulación de la expresión de los TLR.

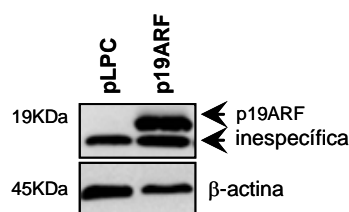
## 5 LA SOBRE-EXPRESIÓN DE p19ARF RESCATA EL FENOTIPO DE LAS CÉLULAS p19Arf<sup>-/-</sup>

El aumento de expresión de p16INK4A en las células deficientes para p19ARF hacía necesario comprobar si los efectos vistos en estas células eran debidos a la deficiencia de

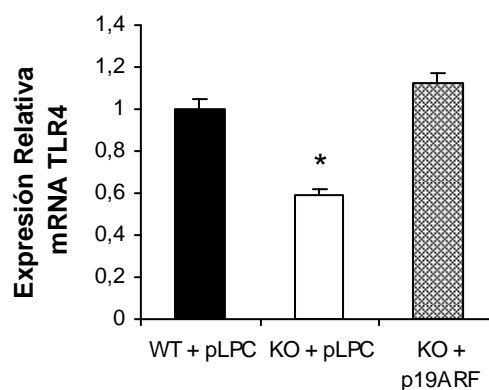
## Resultados

p19ARF o al aumento de p16INK4A. Empleando un vector de expresión introdujimos de forma transitoria la proteína p19ARF en macrófagos carentes de la proteína endógena. Nuestro objetivo era revertir los efectos vistos en respuesta inflamatoria y demostrar que los defectos observados en estas células deficientes en p19Arf eran, efectivamente, debidos a la ausencia de esta proteína. El resultado de sobre-expresar a altos niveles la proteína de p19ARF en los macrófagos fue la reversión de los efectos sobre el mRNA de TLR4 y NOS-2 (Figura 16). Así, la expresión de TLR4 aumentó al reintroducir p19ARF y en el caso de NOS-2, esta aumentó con respecto a los KO transfectados con el vector vacío tras tratamiento con LPS.

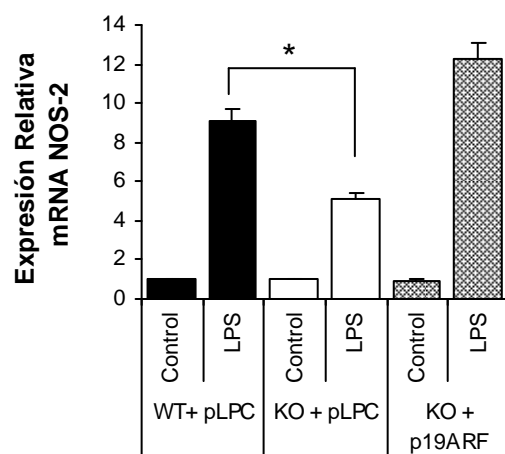
A



B

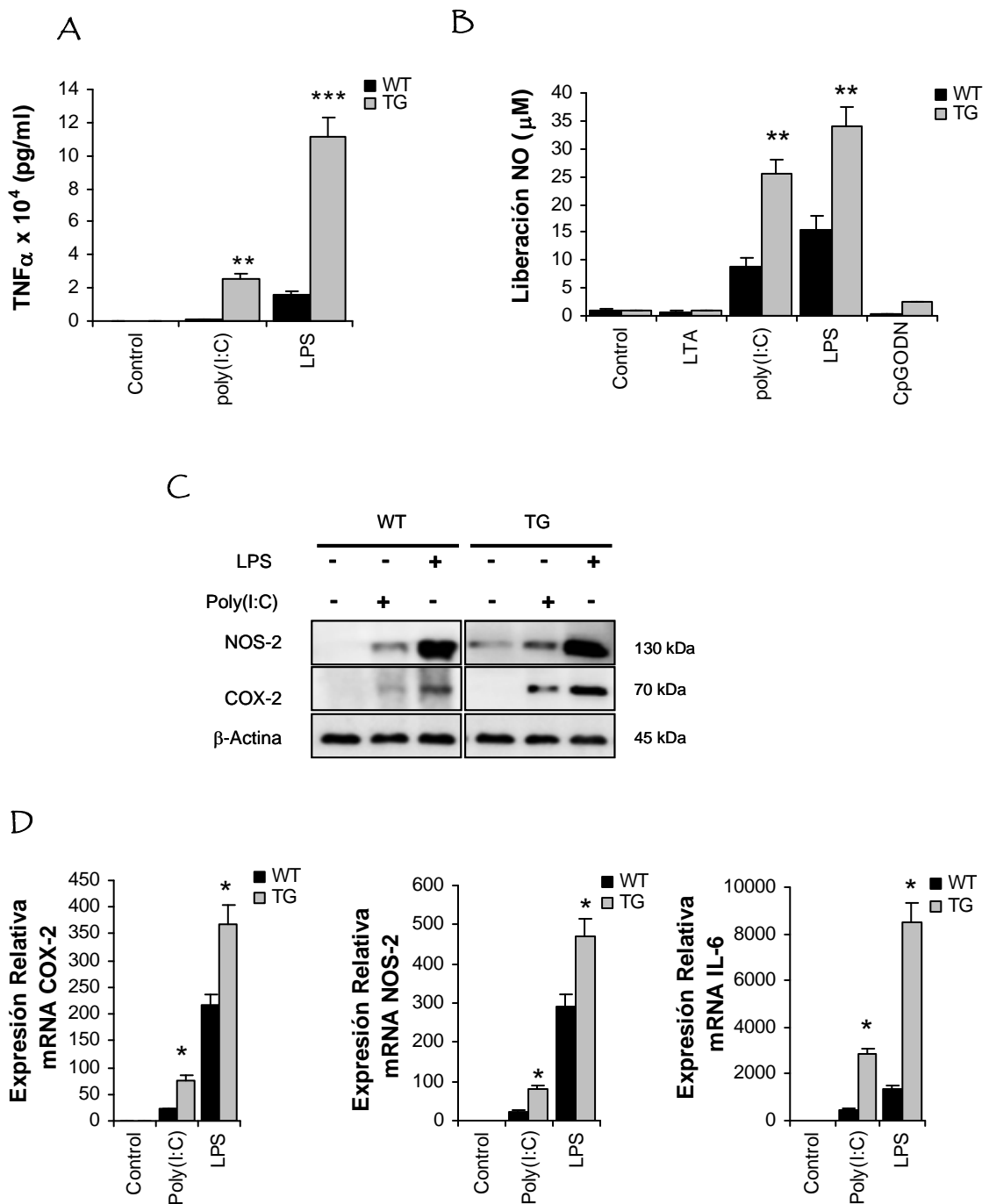


C



**Figura 16. Sobre-expresión de p19ARF en células deficientes** A) Los macrófagos peritoneales p19Arf<sup>-/-</sup> se transfectaron con el vector de expresión de p19ARF y la proteína fue detectada por WB. B) El mRNA de TLR4 se valoró mediante Q-PCR en macrófagos WT y macrófagos KO transfectados con el vector vacío (pLPC) o el plásmido de expresión de p19ARF. C) La inducción de NOS-2 fue determinada mediante Q-PCR en los macrófagos peritoneales de animales WT y animales p19Arf<sup>-/-</sup> transfectados con vector vacío o con p19ARF, en presencia o ausencia de LPS 200ng/ml. Los resultados fueron obtenidos en tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado y los datos indican la media  $\pm$  D.E. \* $p < 0,05$ .





**Figura 17. Respuesta inflamatoria en animales superInk4a/Arf.** **A)** Los macrófagos peritoneales de animales WT y animales TG (transgénicos) para p19ARF fueron activados con LPS 200ng/ml y poly I:C 30μg/ml durante 24h. La producción de citoquinas se determinó mediante el ensayo de “Bio-Plex cytokine assay”. **B)** Los macrófagos WT o TG sin tratar o tratados con varios ligandos de TLR, 10μg/ml LTA; 30μg/ml poly(I:C); 200 ng/ml LPS y 8μg/ml CpGODN durante 24 h; la liberación de NO se determinó mediante el método de Griess. **C)** Los niveles de proteína de NOS-2 y COX-2 fueron evaluados por WB tras estimular los macrófagos peritoneales con 200 ng/ml de LPS y 30 mg/ml poly I:C durante 4 h, se muestra un gel representativo de tres experimentos independientes. **D)** Para cuantificar el mRNA de NOS-2, COX-2 e IL-6 mediante Q-PCR, los macrófagos fueron tratados con 200 ng/ml de LPS y 30 mg/ml poly I:C durante 4 h. Los resultados fueron obtenidos en tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado y los datos indican la media ± D.E. \*p< 0,05, \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001 con respecto a los ratones WT.

Para corroborar los datos de sobre-expresión empleamos un sistema menos “invasivo” mediante el empleo de animales transgénicos que sobre-expresan p19ARF, esto es, animales que contienen una copia extra del locus p16Ink4a/Arf (SuperInk4a/Arf). Estos ratones mostraron una respuesta inflamatoria ligeramente aumentada, como pudimos constatar al medir mediadores claves inflamatorios como TNF $\alpha$ , IL6, COX-2 y NOS-2 tras estimulación con ligandos específicos de distintos TLR (Figura 17).

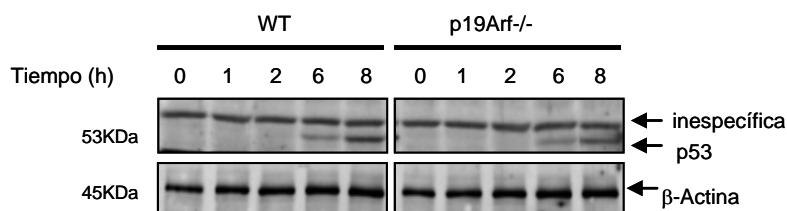
Por lo tanto, estos resultados apoyan la hipótesis de que p16INK4a no debe de ser determinante en la regulación observada de la señalización a través de TLR ya que en los animales transgénicos (TG) (donde hay 1 copia extra de p16Ink4a y p19Arf) y en los animales deficientes para p19Arf [que como hemos visto, también muestran aumento de la expresión de p16INK4a (Figura 12)] el efecto en la respuesta inflamatoria es totalmente opuesto.

## **6 LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA POR p19ARF NO ESTÁ MEDIADA POR p53**

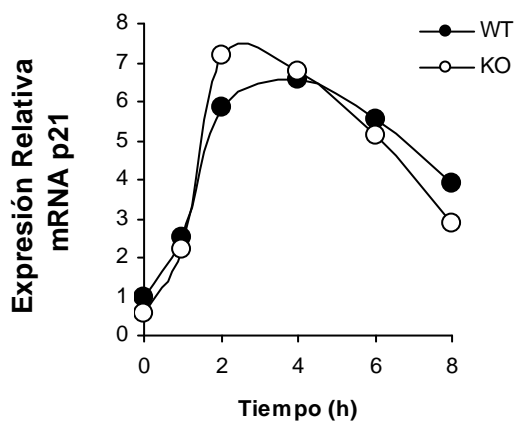
Se han asociado importantes funciones biológicas de p19ARF a su relación con el factor de transcripción p53. De hecho los niveles de p19ARF aumentan en ausencia de p53 como pudimos comprobar en MEFs deficientes para p53 (Figura 11B). Para comprobar si este oncogén era o no uno de los mediadores de los efectos de p19ARF en la expresión de los genes TLR, lo primero que hicimos fue determinar la expresión de p53 en las células WT y p19Arf<sup>-/-</sup> tras estimulación con el agente pro-inflamatorio LPS. Observamos que el patrón de expresión de p53 por LPS (descrita por Xaus *et al.* 2000) parecía prácticamente idéntico en ambos tipos celulares, si acaso, ligerísimamente disminuido en los animales KO a 8 horas de tratamiento (Figura 18A). Sin embargo, debíamos aclarar esta duda, ya que está descrito que la ausencia de p19ARF puede conllevar la disminución de p53 por aumento de la actividad de su regulador negativo Mdm2 (Pomerantz *et al.* 1998; Zhang *et al.* 1998). Para confirmarlo y profundizar en el estado de activación de p53, analizamos por Q-PCR una de sus dianas principales de transcripción, el regulador de ciclo celular p21. Los datos corroboraron que no había diferencias significativas entre los dos tipos de animales (Figura 18B) cuando se estimuló con LPS. Estos resultados descartarían que la

vía de p53-p21 estuviese implicada en la regulación de la vía TLR- NF $\kappa$ B a través de p19ARF.

A



B

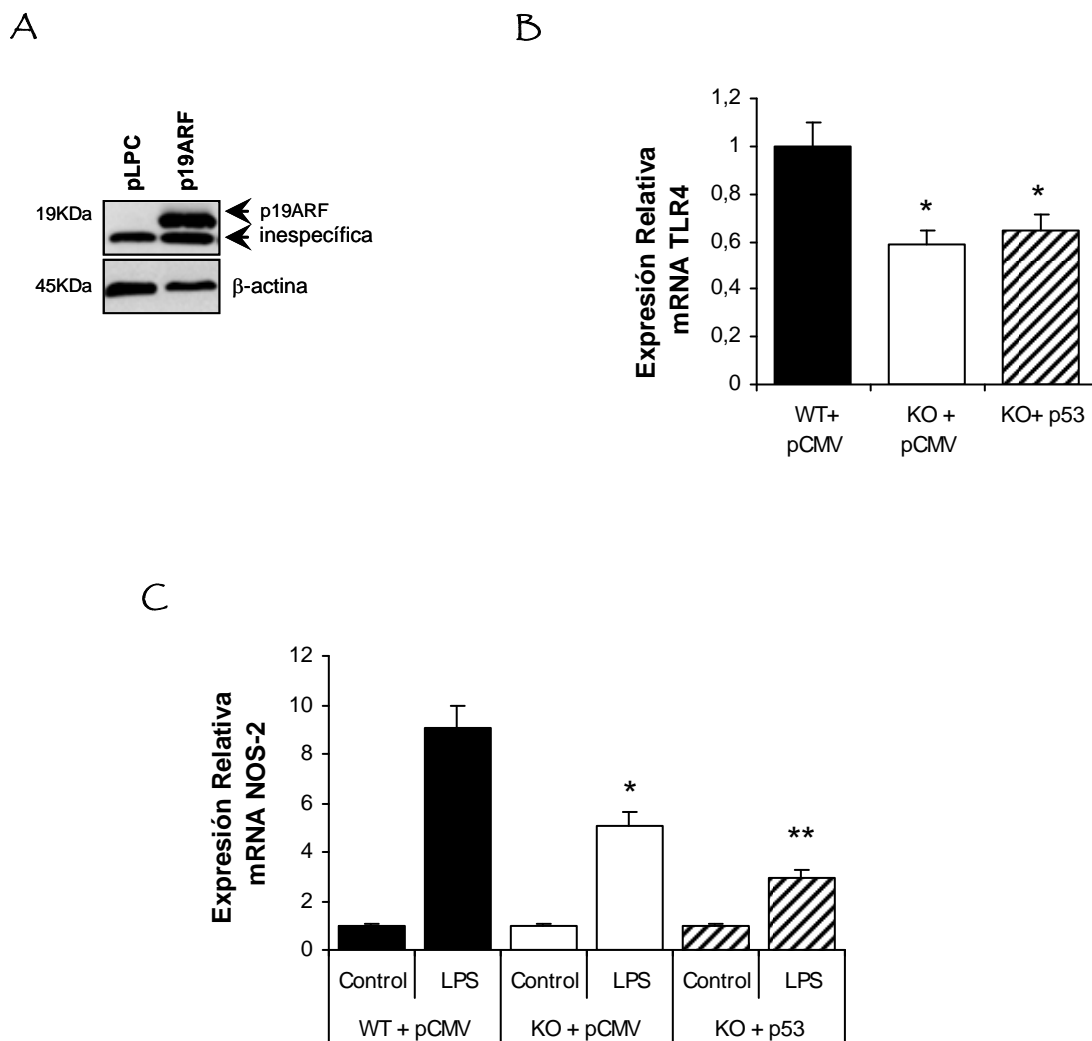


**Figura 18. Regulación de p53.** A) Los macrófagos peritoneales WT y p19Arf<sup>-/-</sup> fueron estimulados con LPS 200ng/ml durante los tiempos indicados y la proteína p53 fue detectada mediante WB, la  $\beta$ -actina se utilizó como control de carga. B) La cantidad de mRNA de p21 fue determinada mediante PCR cuantitativa tras estimulación en las mismas condiciones que en la figura A. Los experimentos se realizaron por triplicado y en A y B se muestra uno representativo. Inespecífica= banda correspondiente a unión inespecífica de los anticuerpos.

Para despejar cualquier duda sobre la regulación de p53 y descartar completamente que pudiese estar mediando la regulación de la respuesta a estímulos inflamatorios a través de p19ARF, sobre-expresamos la proteína p53 en los animales deficientes en p19Arf. En estas células determinamos si ésta sobre-expresión de p53 era capaz o no de recuperar el fenotipo que muestran los animales WT. La proteína p53 murina sobre-expresada en los macrófagos peritoneales de los animales p19Arf<sup>-/-</sup> detectada por *western blot* (Figura 19A) no fue capaz de recuperar los niveles de TLR4 respecto a las células WT (Figura 19B).

## Resultados

Respecto a los niveles de NOS-2, la sobre-expresión de p53 no sólo no hizo aumentar los niveles del gen inflamatorio sino que, como está descrito (Forrester *et al.* 1996; Ambs *et al.* 1998), la sobre-expresión de p53 disminuyó la expresión de NOS-2 (Figura 19C).

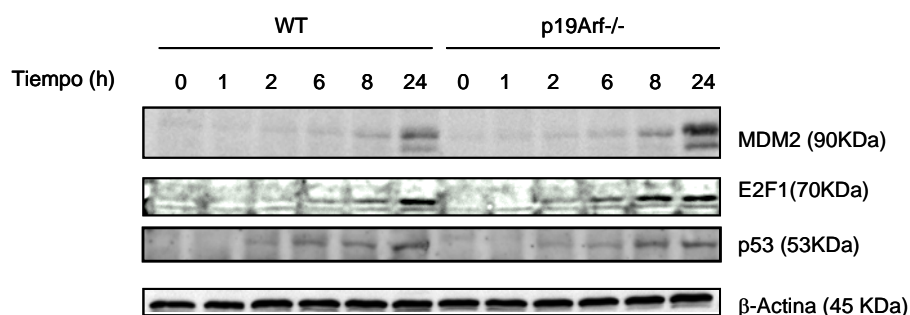


**Figura 19. Sobre-expresión de p53 en macrófagos deficientes para p19ARF.** **A)** Los macrófagos KO fueron nucleotransfectados con el vector vacío pLPC o pCMV, con el vector para p19ARF o con el vector de expresión de p53 murina y los niveles de esta proteína se detectaron por *western-blot* en los extractos totales, se muestra un experimento representativo de los tres. **B)** El mRNA de TLR4 se cuantificó en las células de animales WT y p19Arf<sup>-/-</sup> **C)** La inducción del mRNA de NOS-2 se examinó por Q-PCR en las células WT y p19Arf<sup>-/-</sup> no transfectadas y transfectadas con el vector de expresión de p53 en presencia o ausencia de LPS 200ng/ml. Los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes, se muestra la media  $\pm$  .D.E.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, podemos concluir que p53 no es un factor de transcripción indispensable en la regulación de la vía de los TLR a través de p19ARF. Estos datos están en consonancia con los observados por Garcia *et al.* 2006, donde se describe que la función anti-viral de p19ARF es independiente de p53.

## 7 OTROS CANDIDATOS POSIBLES PARA REGULAR LA VÍA TLR-p19ARF

Una vez descartado p53 como principal regulador de la vía p19ARF-TLR nos propusimos estudiar el estado de otras moléculas relacionadas estrechamente con ARF. Comprobamos que MDM2 sí que experimenta una regulación notable por la estimulación de TLR4 con LPS a 8 y 24h y que este aumento es notablemente superior en los animales deficientes para p19ARF (Figura 20). El aumento en el tiempo podría ser debido a la actividad de p53 (que activa la transcripción del gen Mdm2), que como vimos en la Figura 18 se induce por LPS, sin embargo no se observa un mayor aumento de p53 a las 24h (Figura 20) por lo que a este tiempo la activación de p53 no explicaría el incremento observado en MDM2. Esta ubiquitin-ligasa, se asocia a p53 y promueve su degradación (Haupt *et al.* 1997; Kubbutat *et al.* 1997). Sin embargo, como está descrito para otros sistemas, MDM2 también tiene funciones independientes de p53 (Ganguli *et al.* 2003), y este podría ser un caso más. De hecho hemos visto que una diana relacionada con MDM2, como es E2F1 (Martin *et al.* 1995), está también aumentada en nuestro sistema, lo que podría ser explicado por el hecho de que ARF puede activar la ubiquitinación de E2F-1 (Martelli *et al.* 2001) (Figura 20). No sería descartable que E2F1 participase en la inhibición de la activación de NFκB como ya se ha descrito en endotelio (Chen *et al.* 2002). Tampoco podemos descartar que esté participando en la regulación de la expresión de TLR, ya que por ejemplo el promotor de TLR4 contiene sitios de unión para este factor de transcripción (datos obtenidos *in silico* mediante el programa TFSEARCH, <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>, que utiliza matrices transfac).



**Figura 20 Nivel de expresión de otras moléculas implicadas en la vía de p19ARF .** Las proteínas MDM2, E2F1, p53 y β-Actina (como normalizador de carga) fueron detectadas mediante WB en muestras de extractos totales procedentes de macrófagos peritoneales tratados con LPS 200ng/ml durante los tiempos indicados. Se muestra un gel representativo de tres experimentos independientes.

Estos resultados sugieren que MDM2 y E2F1 u otras vías relacionadas podrían tener algún papel en la regulación la expresión de los TLR. Se abre por tanto aquí una línea de estudio que requerirá de futuras investigaciones.

## 8 LA AUSENCIA DE p19ARF MODIFICA EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE SUPERFICIE IMPLICADAS EN LA DIFERENCIACIÓN, ACTIVACIÓN Y EXTRAVASACIÓN DE LEUCOCITOS

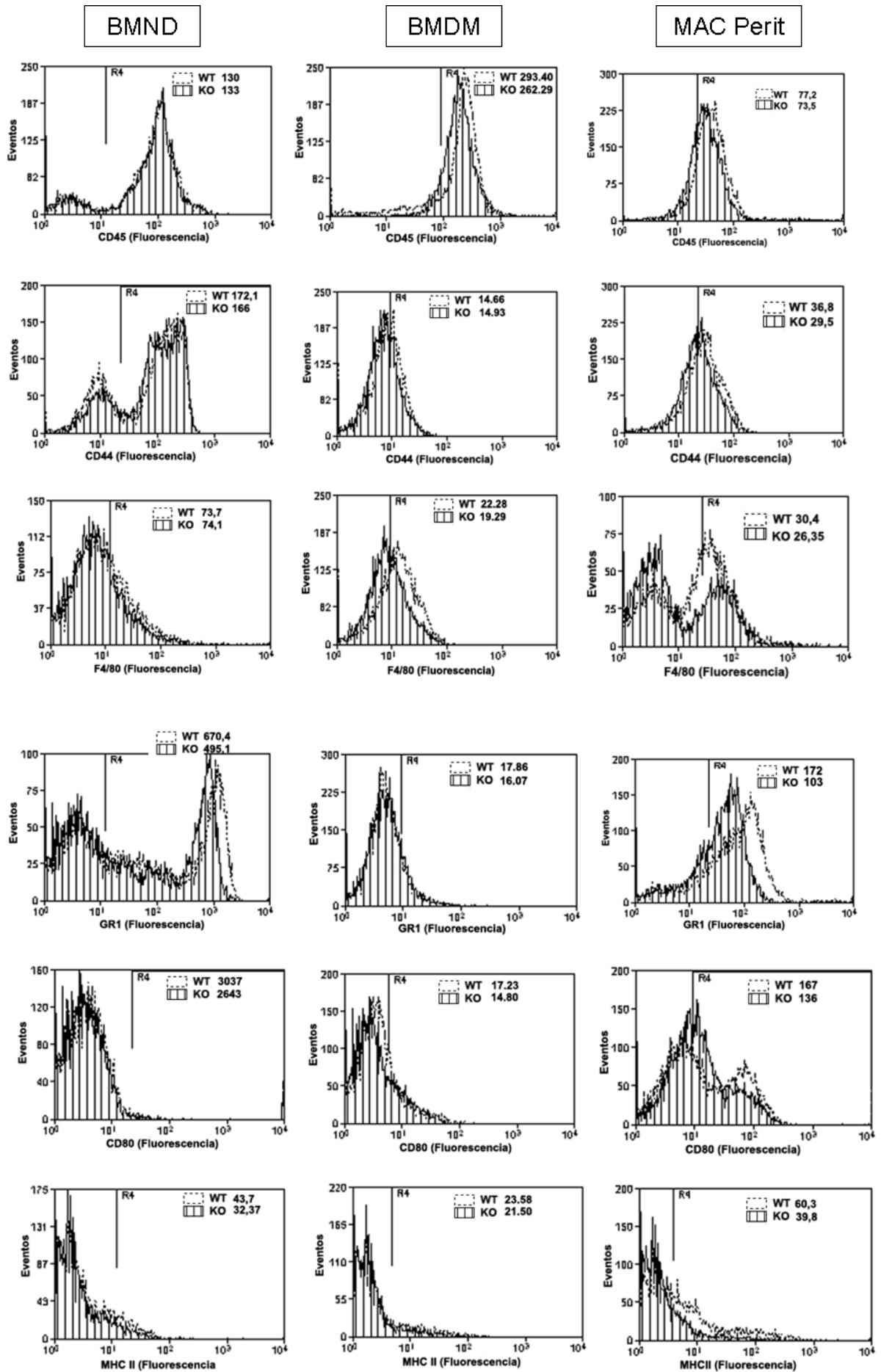
El defecto observado en la activación de la ruta inflamatoria, la expresión de los TLR y la deficiencia en la expresión de quimioquinas importantes para la diferenciación y activación de leucocitos en los macrófagos de animales deficientes en p19Arf (Tabla 1), nos llevó a interesarnos por el efecto en la expresión en la superficie celular de moléculas relacionadas con la diferenciación, activación y extravasación de leucocitos. Para ello analizamos por citometría tres poblaciones leucocitarias murinas de distinto grado de maduración y activación:

- precursores hematopoyéticos de médula ósea (células hematopoyéticas inmaduras extraídas de médula ósea): BMND
- macrófagos derivados de médula ósea (madurados en medio rico en M-CSF): BMDM
- células peritoneales extraídas tras 96 horas después de inyección peritoneal con tioglicolato (leucocitos activados con un estímulo inflamatorio, principalmente macrófagos): MAC perit

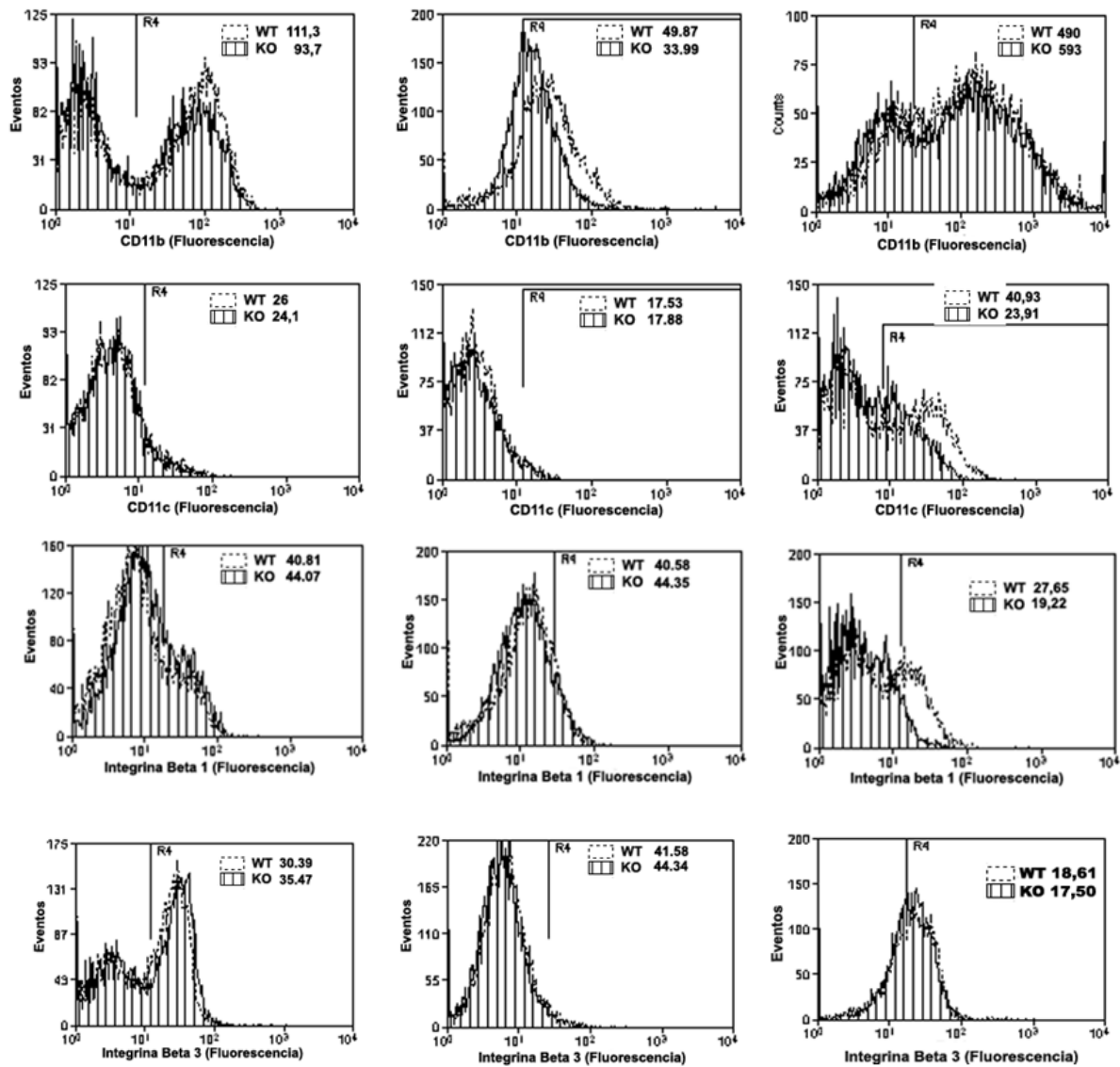
<b>CD45</b> ( <i>Leukocyte Common Antigen</i> ): Marcador de línea leucocítica, monocitos, macrófagos, granulocitos y linfocitos.
<b>CD44</b> : Marcador de células hematopoyéticas. Receptor de adhesión, un ácido hialurónico de la matriz extracelular.
<b>F4/80</b> : Marcador de macrófagos murinos.
<b>GR1</b> : Marcador de granulocitos. También presente (en menor medida) en macrófagos inflamatorios (los monocitos murinos residentes apenas expresan GR1 (Imhof <i>et al.</i> 2004)).
<b>CD80</b> : Marcador de células B activadas, linfocitos T, macrófagos M1 y M2b y células dendríticas
<b>MHC II</b> : Marcador de células presentadoras de antígeno (macrófagos activados inflamatorios, células dendríticas y linfocitos B. (Aparece en macrófagos M1, M2a y M2b)
<b>CD11b</b> (Integrina $\alpha_M$ ó Mac-1): Marcador de monocitos, macrófagos, granulocitos, NK y algunos linfocitos B y T.
<b>CD11c</b> (Integrina $\alpha_x$ ): Marcador de granulocitos, linfocitos T, NK, DCs y macrófagos (inducible por inflamación (Hume 2008)). (Los monocitos no expresan).
<b>Integrina Beta 1</b> : Marcador de leucocitos implicado en la adhesión y extravasación.
<b>Integrina Beta 3</b> : Marcador de granulocitos, linfocitos y células endoteliales y plaquetas implicado en la adhesión y extravasación.

**Tabla 2. Marcadores de superficie celular.** Lista de los marcadores de superficie celular estudiados para caracterizar el patrón de moléculas de adhesión y el grado de maduración de las 3 poblaciones macrofágicas.

# Resultados







**Figura 21. Expresión de moléculas de superficie.** Los precursores mieloides de médula ósea (BMND), los macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) y los macrófagos peritoneales (Mac Perit) fueron incubados con los correspondientes anticuerpos primarios (se muestran en la tabla) y secundarios y fueron analizados por citometría de flujo (tal y como se explica en Materiales y métodos). Se muestran gráficas representativas de tres experimentos independientes para cada condición. Se muestra la media de la intensidad de fluorescencia de un experimento representativo.

Del análisis de estos resultados (Figura 21) podemos sacar las siguientes conclusiones:

Los animales WT y KO no muestran diferencias en el total de leucocitos (**CD45**) ni en los precursores hematopoyéticos en el caso de BMDN (**CD44**).

La presencia de monocitos/macrófagos (**F4/80**) en ausencia de p19ARF se ve ligeramente disminuida en estas condiciones en BMDM y en macrófagos peritoneales (estudiaremos esta situación más en detalle en el apartado 11.1).

La población de granulocitos (identificada por marcaje con **GR1**) está sensiblemente disminuida en los BMND y en el exudado peritoneal de animales KO para p19Arf (en este caso la tinción positiva podría deberse además a la presencia de macrófagos inflamatorios) (de acuerdo con lo esperado todos los BMDM son negativos para este marcaje).

En el caso de las **integrinas**, moléculas fundamentales en la capacidad de adhesión y extravasación de los leucocitos activados, observamos diferencias en la expresión de **CD11b** (Integrina  $\alpha_M$ ) que se aprecia levemente reducida en BMDM deficientes para p19ARF, los macrófagos peritoneales maduros muestran una notable expresión, pero no se detectan diferencias significativas entre WT y KO [sin embargo la expresión del mRNA de esta integrina es menor en macrófagos peritoneales de animales KO que en WT *microarray* (Tabla 3)]. Respecto a la expresión de **CD11c** (Integrina  $\alpha_X$ ) e **Integrina  $\beta_1$**  en los macrófagos peritoneales, de nuevo, los KO muestran reducción en la expresión. No observamos diferencias significativas para **Integrina  $\beta_3$**  que además fue débilmente detectada.

**CD80**, que es un marcador típicamente asociado a células activadas (presente en el fenotipo M1 y M2b de macrófagos) está ligeramente infra-expresado en el lavado peritoneal de los animales KO.

Respecto al marcador de células presentadoras **MHCII**, aunque su presencia no fue detectada en altos niveles en ningún caso (es inducido por señales inflamatorias como LPS), observamos una considerable reducción en el exudado peritoneal de ratones KO respecto a los WT, lo que indicaría un menor grado de activación por tioglicolato de los macrófagos carentes de p19ARF.

En conclusión estos datos nos indican que p19ARF podría tener también alguna implicación en la capacidad de activación y extravasación de células leucocitarias al foco de inflamación.

Los anticuerpos y condiciones elegidos no nos permitieron conseguir buenos marcajes para formas activas de integrinas como 9EG7 (Integrina  $\beta_1$  activa), la VLA4 (Integrina  $\alpha_4\beta_1$ ) o LFA1 (Integrina  $\alpha_L\beta_2$ , CD11a/CD18).

A la vista de estos resultados, decidimos comprobar la funcionalidad de las moléculas de adhesión de los macrófagos peritoneales (que son los que más deficiencias de expresión mostraron) mediante ensayos de adhesión que analizaremos a continuación.

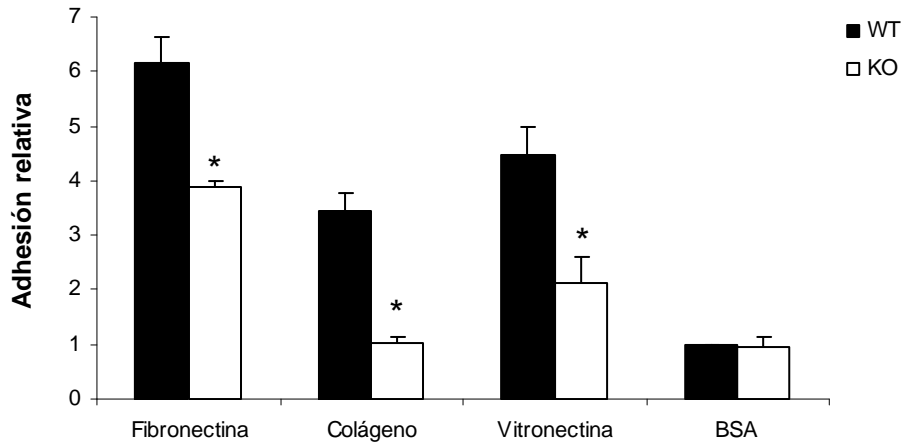
## **9 LA AUSENCIA DE p19ARF MERMA LA CAPACIDAD DE ADHESIÓN DE LOS MACRÓFAGOS**

Una de las características principales de la activación de macrófagos en situaciones inflamatorias es su capacidad para adherirse al endotelio activado y extravasarse al tejido inflamado a través de su interacción con la matriz extracelular. Por eso quisimos comprobar si la ausencia de p19ARF y/o la deficiencia en la expresión de citoquinas y receptores de quimioquinas estaba efectivamente teniendo un efecto fisiológico en la capacidad de adherencia de los macrófagos, tanto a los componentes de la matriz extracelular como al endotelio.

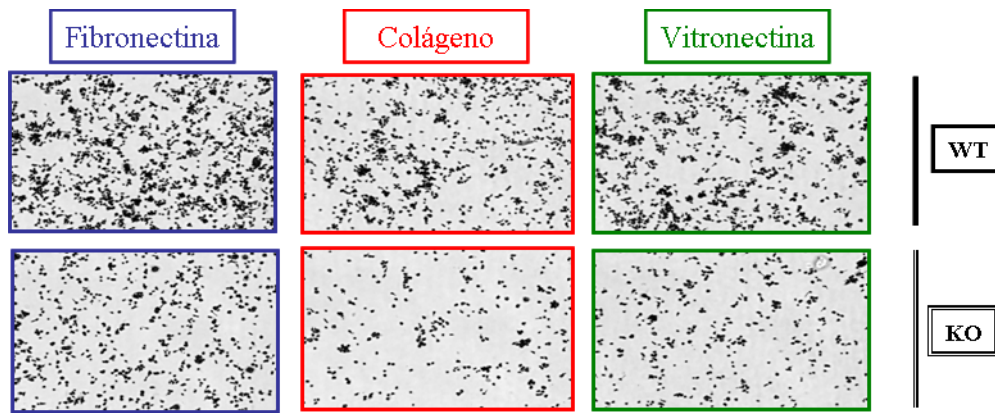
### **9.1 Adhesión *in vitro***

Para comprobar si la adhesión de los macrófagos peritoneales deficientes en p19Arf estaba afectada realizamos experimentos de adhesión *in vitro* tanto sobre sustratos típicos de matriz extracelular (Figura 22A y B) como en monocapa de endotelio de ratón (Figura 23A y B). En ambos casos comprobamos que efectivamente la ausencia de p19ARF merma la capacidad de adhesión de los macrófagos peritoneales obtenidos por i.p. de tioglicolato. Por tanto, p19ARF es necesaria para mantener la funcionalidad de estos macrófagos para responder adecuadamente ante un estímulo inflamatorio.

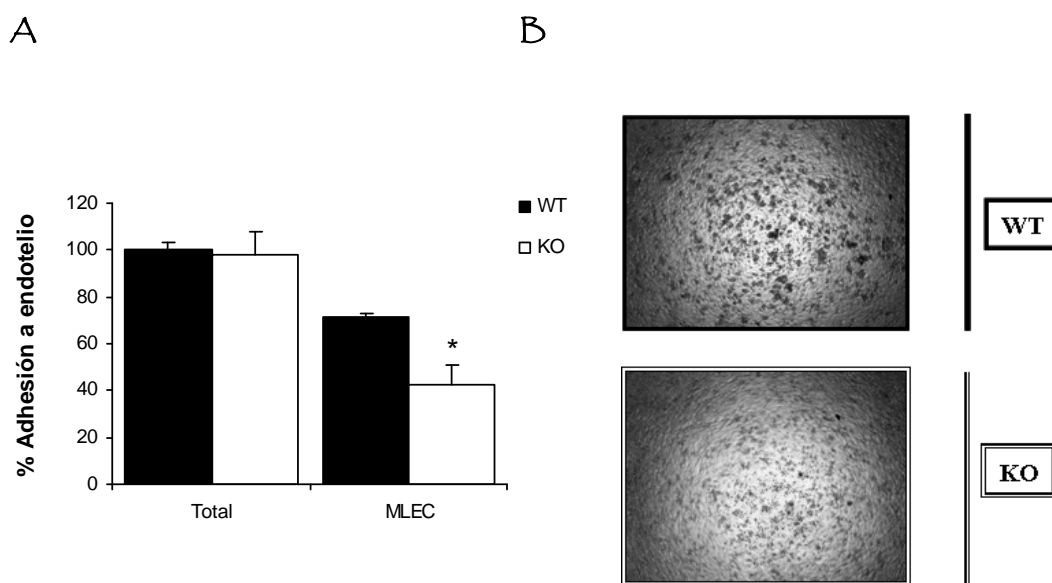
A



B



**Figura 22 Adhesión de macrófagos a sustratos de matriz A)** Los macrófagos peritoneales obtenidos de ratones WT y KO (p19Arf<sup>-/-</sup>) fueron incubados con los distintos sustratos y se midió la adherencia mediante tinción celular y medida en espectrofotómetro. **B)** Los macrófagos fueron cultivados igual que en A, mostrándose fotografías representativas de los macrófagos adheridos a los sustratos correspondientes. Los resultados fueron obtenidos en tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado y los datos indican la media  $\pm$  desviación estándar (S.D.) \* $p < 0,05$  con respecto a los ratones WT.



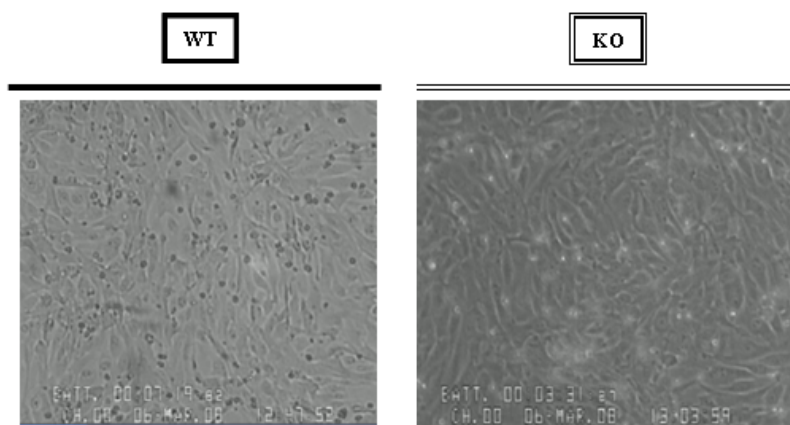
**Figura 23. Adhesión de macrófagos a endotelio** **A)** Los macrófagos peritoneales de animales WT y KO (100.000 células por pocillo) se incubaron sobre endotelio de pulmón activado con  $\text{TNF}\alpha$  (MLEC) y se cuantificó la adhesión mediante fluorimetría, se muestra el porcentaje respecto a la fluorescencia del total de macrófagos añadidos. **B).** Igual que en A, se muestran imágenes representativas de la adhesión de los macrófagos al endotelio. Los resultados fueron obtenidos en tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado y los datos indican la media  $\pm$  D.E. \* $p < 0,05$  con respecto a los ratones WT.

## 9.2 Adhesión en flujo

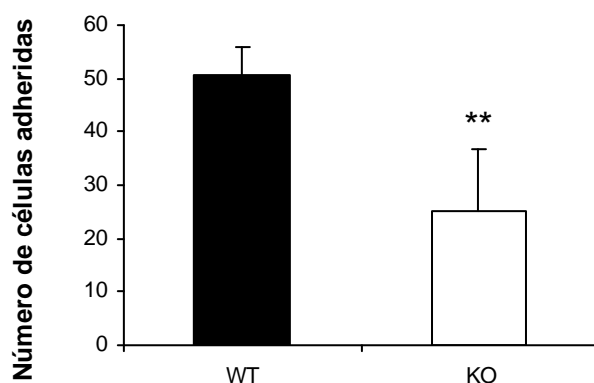
Por último, para comprobar la capacidad de adhesión de los macrófagos procedentes de los animales KO, llevamos a cabo un ensayo de adhesión en flujo laminar, que pretende imitar el proceso de adhesión y extravasación de los monocitos y macrófagos durante el proceso inflamatorio.

Como se muestra en el vídeo anexo (macrófagos WT desde el tiempo 12.40 al 13.32 y macrófagos KO desde el tiempo 13.41 al 14:09) y en la Figura 24, la capacidad de los macrófagos peritoneales para adherirse a una monocapa de células endoteliales en condiciones que emulan el flujo sanguíneo también está disminuida en los animales KO para p19Arf respecto a los macrófagos WT.

A



B



**Figura 24 Adhesión de macrófagos en flujo.** Los macrófagos peritoneales de animales WT y KO se hicieron pasar en flujo dinámico sobre endotelio de pulmón activado con  $\text{TNF}\alpha$  (MLEC). **A)** Se muestra una imagen representativa de la adhesión para cada tipo de macrófagos. **B)** Se cuantificaron las células adheridas bajo un flujo de  $1,8 \text{ dyn/cm}^2$ , se muestra la media  $\pm$  D.E. de 6 campos analizados de un experimento representativo \* $p < 0,05$  con respecto a los ratones WT.

La capacidad de adhesión que adquieren los leucocitos se debe a la activación provocada por la interacción con quimioquinas liberadas por el endotelio activado y otras células del tejido inflamado. Por esto, teniendo en cuenta los resultados de adhesión junto con los aportados por el *microarray* (Tabla 1) respecto a los receptores de quimioquinas, los datos indican que p19ARF participa activamente en el mantenimiento funcional de la capacidad de los macrófagos murino para responder adecuadamente a la activación por quimioquinas y posiblemente en la activación de moléculas de adhesión.

Estos modelos se aproximan notablemente a las condiciones fisiológicas *in vivo* y hacía pensar que la carencia de ARF para participar en los fenómenos inflamatorios en el

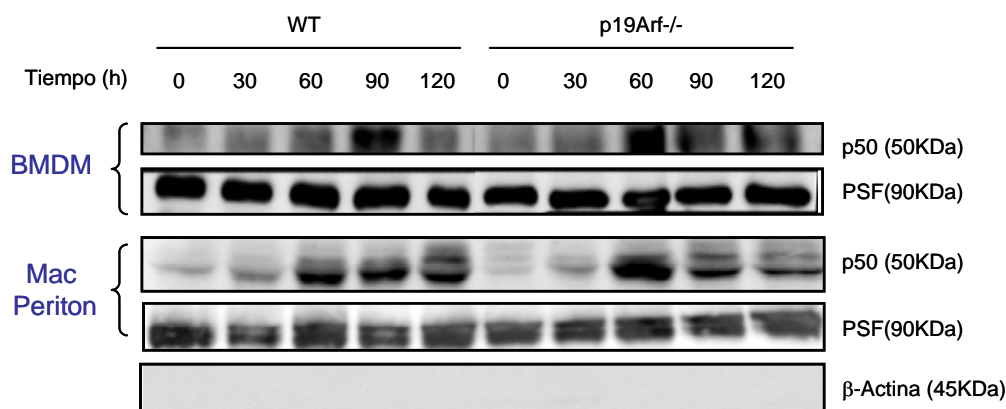
organismo vivo podría tener una repercusión importante, como analizaremos en los siguientes apartados.

## **10 LA AUSENCIA DE p19ARF ALTERA LA POLARIDAD M1-M2 DE LOS MACRÓFAGOS**

Nuestro interés por la caracterización del perfil de polarización M1-M2 de los macrófagos deficientes para p19ARF surgió por dos importantes motivos: Por un lado, la deficiencia observada en la vía de NFκB, la reducción en la activación de la NOS-2 y el aumento de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 en los macrófagos deficientes para p19ARF; y por otro, el hecho de que los TAM (macrófagos asociados a tumores con baja actividad citotóxica y con acción pro-tumoral) habitualmente con un perfil M2 (Mantovani *et al.* 2002), pudiesen favorecer la aparición de tumores característicos de estos animales.

Realizamos medidas de la expresión del mRNA de marcadores de perfil M2 como el receptor de manosa y la enzima Arginasa I (Mantovani *et al.* 2004) sin embargo, no conseguimos obtener datos verdaderamente consistentes que mostrasen una tendencia significativa en la regulación de estas moléculas en los macrófagos peritoneales o BMDM KO (datos no mostrados).

Otra forma de estudiar el sesgo en la diferenciación M1/M2 de macrófagos es la translocación al núcleo de la subunidad p50 de NFκB como característica propia de los macrófagos M2, donde p50 competiría por la activación llevada a cabo por p65 (Porta *et al.* 2009). Sin embargo, como se muestra en la Figura 25 es difícil concluir qué papel está desempeñando p50 en los animales KO, ya que, lo que se aprecia es que su translocación al núcleo está adelantada en el tiempo respecto a los macrófagos WT, sin embargo, esta activación no está sostenida en el tiempo y parece que disminuye a tiempos más largos. Será necesario profundizar en la expresión de moléculas diana de p50 o su capacidad para unirse a DNA para concretar sus niveles de activación.



**Figura 25. Translocación de p50 al núcleo de macrófagos (perfil M2).** Los macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) y los macrófagos peritoneales (Mac Periton) fueron tratados con LPS 200 ng/ml de LPS durante los tiempos indicados. Posteriormente se obtuvieron los extractos nucleares y se analizaron por *western-blot* con los anticuerpos contra *anti-p50* y *anti-PSF* (normalizador de carga para núcleo) y *anti-β-Actin* (para asegurarnos que no quedan restos citoplasmáticos). Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos independientes.

Sin embargo, a pesar de estos resultados pocos concluyentes, el análisis del perfil inflamatorio de los macrófagos deficientes en p19Arf los acerca al perfil anti-inflamatorio tanto en condiciones basales o por inducción con LPS, ya que comparten con el perfil M2 una reducida expresión de NOS-2, TLR4 y TLR2 y citoquinas pro-inflamatorias junto con una elevada producción de IL-10. Además si analizamos de nuevo en detalle la información aportada por la expresión de mRNA del *microarray* (Tabla 3) para las condiciones basales (sin estimular con LPS, ya que este tiende a potenciar el fenotipo M1) y nos fijamos en la expresión de quimioquinas características de los perfiles M1 ó M2 podemos comprobar que ciertas quimioquinas e interleuquinas típicas de M2 como CCL1, CCL17, CCL19, CCL20 CCL22, CCL24, IL4 e IL13 están notablemente aumentados respecto a los WT. Sin embargo, no podemos obviar el hecho de que también están aumentados basalmente otros marcadores de M1 como CCR7, CXCL11, CXCL15, CXCL9.

Al mismo tiempo, como podemos ver en la Tabla 1, otros marcadores típicos de M1 inducidos por el LPS, presentan niveles significativamente inferiores en los macrófagos deficientes para p19ARF tras la estimulación con este ligando, son: CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, IL-R1, CXCL9, CXCL10, CXCL11 y CCR2 [este último altamente reprimido en los TAM (Mantovani *et al.* 2002)].



Gen	WT Control	KO control
Abcf1	1	1,12
Bcl6	1	1,22
Blr1	1	4,02
C3	1	-1,17
Casp1	1	1,29
Ccl1	1	2,78
Ccl11	1	7,16
Ccl12	1	1,13
Ccl17	1	3,13
Ccl19	1	3,00
Ccl2	1	1,89
Ccl20	1	3,17
Ccl22	1	2,82
Ccl24	1	2,03
Ccl25	1	2,03
Ccl3	1	1,33
Ccl4	1	1,38
Ccl5	1	1,04
Ccl6	1	1,22
Ccl7	1	2,74
Ccl8	1	2,77
Ccl9	1	1,27
Ccr1	1	1,49
Ccr2	1	1,30
Ccr3	1	-1,23
Ccr4	1	2,12
Ccr5	1	-1,25
Ccr6	1	4,84
Ccr7	1	3,06
Ccr8	1	2,67
Ccr9	1	2,13
Crp	1	5,22
Cx3cl1	1	1,86
Cxcl1	1	2,49
Cxcl10	1	-1,13
Cxcl11	1	4,21
Cxcl12	1	3,58
Cxcl13	1	9,04
Cxcl15	1	27,77
Cxcl4	1	-2,02
Cxcl5	1	7,04
Cxcl9	1	2,44

Gen	WT Control	KO control
Cxcr3	1	1,14
Ccr10	1	1,09
Ifng	1	3,14
Il10	1	1,02
Il10ra	1	-1,37
Il10rb	1	1,02
Il11	1	10,74
Il13	1	3,12
Il13ra1	1	-1,39
Il15	1	1,33
Il16	1	-1,29
Il17b	1	3,81
Il18	1	-1,05
Il1a	1	1,88
Il1b	1	-1,13
Il1f6	1	5,34
Il1f8	1	2,16
Il1r1	1	1,57
Il1r2	1	2,65
Il20	1	2,96
Il2rb	1	1,41
Il2rg	1	1,20
Il3	1	3,49
Il4	1	2,75
Il5ra	1	4,68
Il6ra	1	-1,35
Il6st	1	1,72
Il8rb	1	3,34
Itgam	1	-1,34
Itgb2	1	1,19
Lta	1	3,47
Ltb	1	1,02
Mif	1	-1,21
Scye1	1	-1,45
Spp1	1	1,46
Tgfb1	1	1,20
Tnf	1	1,51
Tnfrsf1a	1	1,10
Tnfrsf1b	1	1,22
Cd40lg	1	3,73
Tollip	1	-1,25
Xcr1	1	4,98

**Tabla 3. Lista de genes analizados en el *microarray* de DNA RT<sup>2</sup> PCR para las condiciones basales.** Se extrajo el mRNA de los macrófagos peritoneales de ratones WT y p19Arf<sup>-/-</sup> en condiciones basales y la expresión de genes inflamatorios fue analizada mediante *microarray* de DNA RT<sup>2</sup> PCR. La tasa de expresión relativa se calculó respecto a la condición WT sin tratamiento (=1). En rosa se muestran los niveles de expresión superior a 2 veces y en azul los niveles de expresión inferior a -2. En negro, las variaciones consideradas no significativas, entre -2 y +2. Se muestran con fondo azul genes típicamente relacionados con fenotipo M2, en fondo malva genes del perfil M1. Los resultados muestran la media de 2 muestras independientes por cada condición.

En conclusión, teniendo en cuenta estas medidas de forma global, debemos decir que los resultados no nos permiten atribuir un perfil claro de M2 a los macrófagos deficientes en p19Arf, sin embargo, sí podríamos decir que sí presentan cierta reticencia a adquirir un fenotipo marcado M1, típico del estímulo inflamatorio ejercido por el LPS y claramente adquirido por los WT. En este sentido debemos añadir que la completa caracterización de estos perfiles M1/M2 y su relación con el proceso de tolerización a LPS está sometido actualmente a un intenso debate (Mantovani, 2002 #495} Benoit *et al.* 2008 Porta *et al.* 2009) y que resulta extremadamente complejo la caracterización exacta del perfil M1 y M2, especialmente porque, hasta el momento, se conocen tres tipos de perfiles M2 (M2a, M2b y M2c) que representan un continuo de especializaciones que cubren desde el carácter pro-inflamatorio al anti-inflamatorio.

Por lo tanto, atendiendo a estos análisis podemos concluir que este supresor tumoral ARF puede tener una función relevante en la activación y expresión del fenotipo pro-inflamatorio de las células macrofágicas.

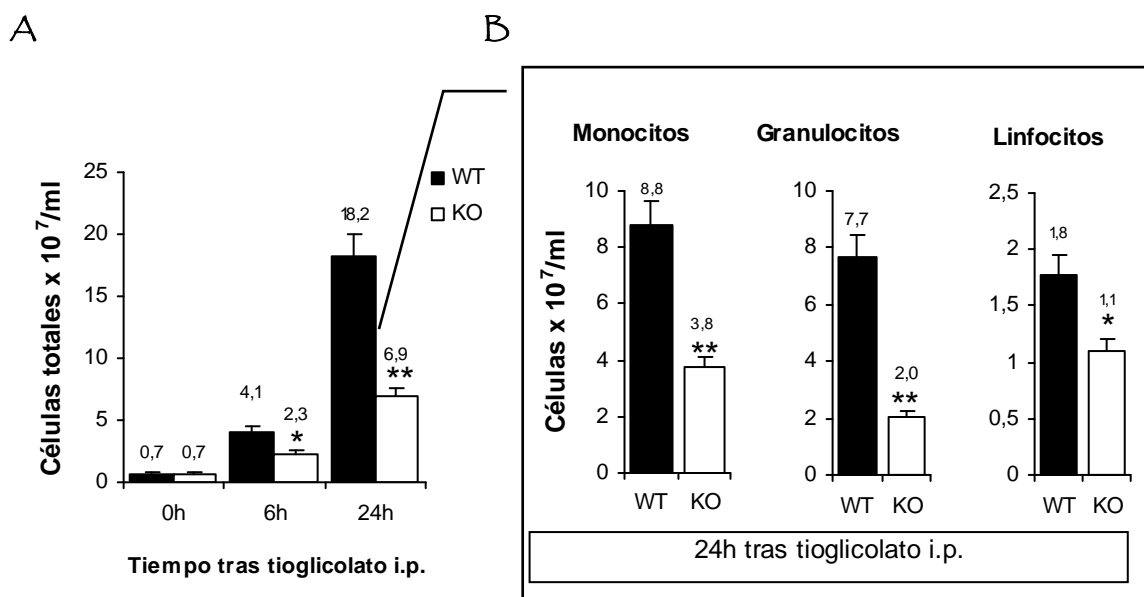
## 11 PAPEL DE p19ARF EN PROCESOS INFLAMATORIOS *IN VIVO*

### 11.1 p19ARF está involucrada en la infiltración de neutrófilos y monocitos en peritonitis

La inflamación aguda se caracteriza por un rápido reclutamiento de leucocitos desde el sistema sanguíneo periférico al punto de la inflamación (Nathan 2002). Para estudiar el papel funcional de p19ARF *in vivo* realizamos ensayos de inducción de peritonitis por tioglicolato, un agente irritante que desencadena una respuesta inflamatoria aguda (Conrad *et al.* 1977; Den Otter *et al.* 1982).

Por recuento mediante citometría, comprobamos que como está descrito (Henderson *et al.* 2003) este tratamiento provoca un elevado reclutamiento de leucocitos (leucocitosis) a la cavidad peritoneal en los ratones WT entre las 6 y las 24 horas (Figura 26A). A diferencia de los animales WT, los animales deficientes para p19Arf tienen disminuida su capacidad de respuesta inflamatoria a agentes irritantes como el tioglicolato, como muestra el hecho de la aparición de un porcentaje menor de leucocitos en el lavado peritoneal, especialmente a las 24 horas (Figura 26A). El análisis por citometría, con marcadores

específicos (que se especifican en Materiales y métodos), nos permite distinguir las distintas subpoblaciones de leucocitos que se reclutan al peritoneo tras el estímulo inflamatorio y este análisis reveló que los animales KO muestran una disminución del 73% respecto al reclutamiento de granulocitos, del 38% respecto a los linfocitos y del 57% de monocitos respecto al WT a las 24 horas tras la administración del tioglicolato (Figura 26B).

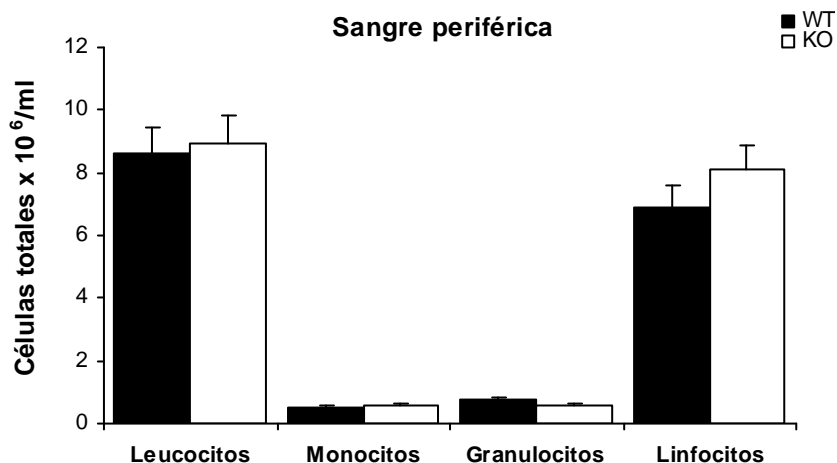


**Figura 26 Peritonitis inducida por tioglicolato** **A)** Los animales WT y p19Arf<sup>-/-</sup> (9 por grupo) fueron inyectados i.p. con tioglicolato y se recogió el lavado peritoneal 6 y 24 horas después. Se muestra la densidad total de células reclutadas en el peritoneo a las 0h (sin inyectar), 6 h y 24 h, cuantificadas en citómetro. **B)** Tipos de leucocitos en el lavado de 24h medidas por citometría. Los resultados se obtuvieron de tres experimentos independientes, se indica su media ± D.E. \* p< 0,05 y \*\* p< 0,01 con respecto a los ratones WT.

Este efecto parece reflejar un defecto en la capacidad de reclutamiento de las células inflamatorias, más que deberse a algún problema en las poblaciones leucocitarias basales ya que, en ausencia de estímulo inflamatorio, los animales no mostraron claras diferencias en estos tipos celulares, tanto en las células residentes, sin estímulo inflamatorio (Figura 26A, tiempo 0), como en las poblaciones de la sangre periférica (Figura 27 y Tabla 4). Para corroborar este estado basal comparamos el peso de algunos de los principales órganos linfopoyéticos, bazo e hígado y comprobamos que no se apreciaban diferencias

## Resultados

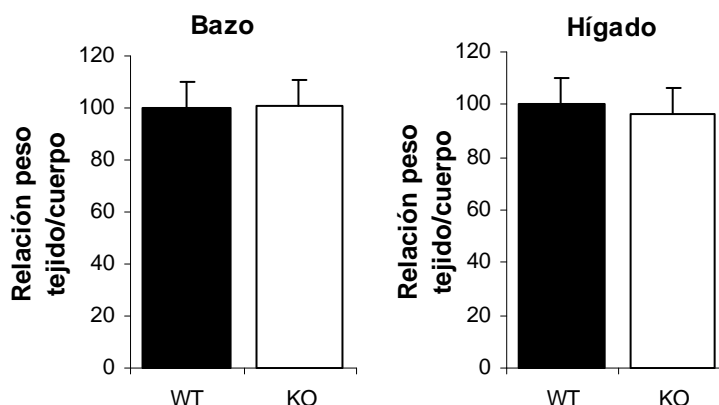
significativas entre los WT y los KO (Figura 28) en animales de menos de 2 meses (que aún no han desarrollado ningún crecimiento tumoral que pudiese afectar al volumen de los órganos).



**Figura 27. Análisis leucocitario de sangre periférica.** Composición de las diferentes poblaciones presentes en la sangre periférica de los animales WT y p19Arf<sup>-/-</sup>. Los resultados muestran la media de 10 animales en cada grupo ± D.E.

Análisis hematológico	WT	KO
Glóbulos blancos totales (x 10 <sup>3</sup> /μl)	8.60 ± 2.05	8.94 ± 2.24
Linfocitos (x 10 <sup>3</sup> /μl)	6.91 ± 1.76	7.08 ± 1.42
Monocitos (x 10 <sup>3</sup> /μl)	0.50 ± 0.47	0.58 ± 0.25
Granulocitos (x 10 <sup>3</sup> /μl)	0.76 ± 0.38	0.58 ± 0.3
Glóbulos rojos (x 10 <sup>6</sup> /μl)	10.56 ± 0.79	11.79 ± 0.58
HGB (hemoglobina) g/dl	16.00 ± 1,47	17.40 ± 0.94
HCT (hematocrito) %	47.03 ± 3.33	48.55 ± 1.95
Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /μl)	696 ± 128	689 ± 24.75

**Tabla 4 Recuento de células de sangre periférica.** La sangre de ratones WT (n=10) y KO (n=10) se extrajo del seno retro-orbital y se cuantificaron las distintas poblaciones celulares. Los datos muestran la media ± D.E.



**Figura 28** Peso de órganos hematopoyéticos. El bazo y el hígado fueron aislados de animales WT y KO (n=10) y se pesaron y normalizaron respecto al peso corporal total. La figura muestra la media  $\pm$  desviación estándar (S.D.).

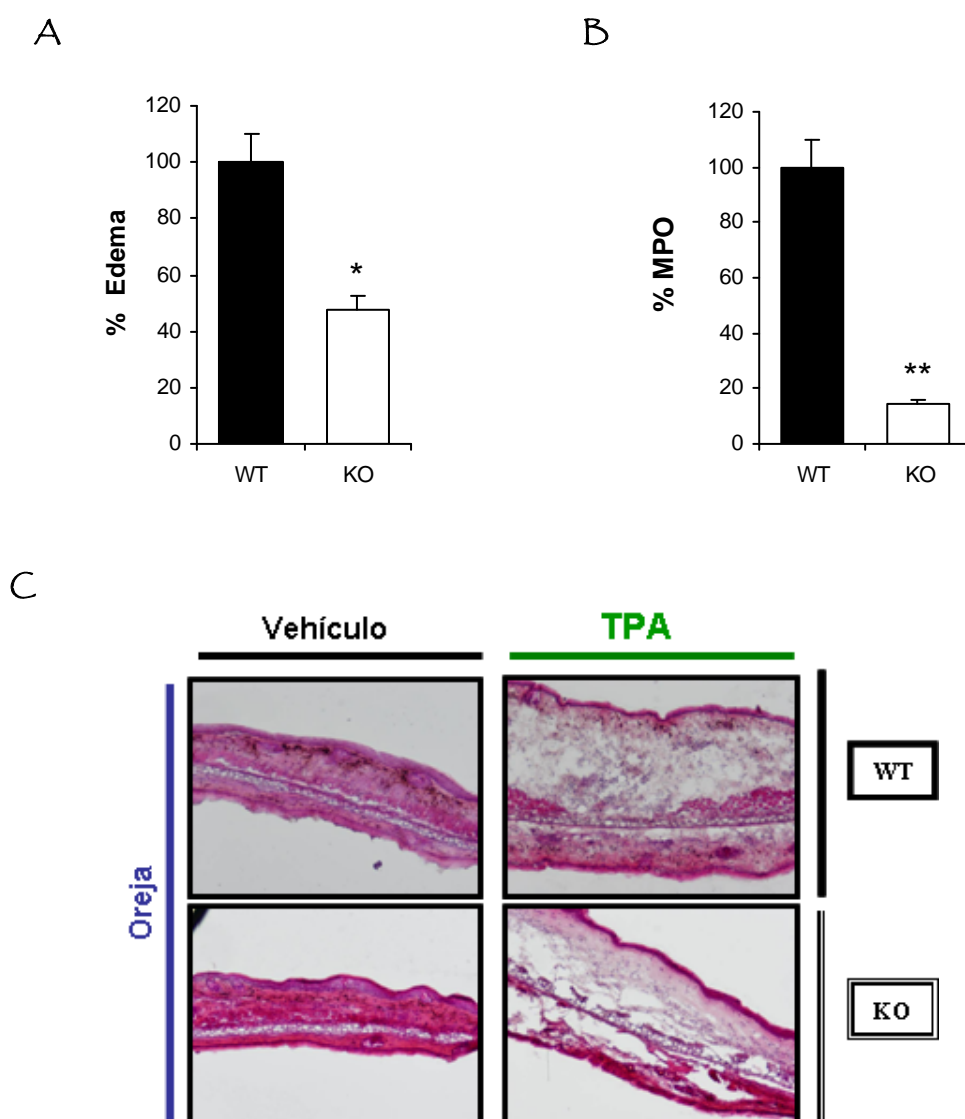
Este primer modelo *in vivo* muestra que el defecto inflamatorio observado en las células macrofágicas en cultivo (caracterizado por la disminución de la expresión de citoquinas y mediadores pro-inflamatorios, además de la expresión de TLR4 y TLR2), junto con el defecto en adhesión y la expresión de moléculas de superficie, podrían estar contribuyendo al menor reclutamiento de células del sistema inmune innato de los animales KO para p19Arf.

### 11.2 La inflamación dérmica inducida por TPA está reducida en los animales p19Arf -/-

Como modelo adicional para el estudio del proceso inflamatorio *in vivo*, utilizamos un modelo clásico de inducción de inflamación consistente en la aplicación tópica de un agente irritante como es el TPA en la oreja de ratón (Carlson *et al.* 1985). Las orejas de los animales WT y KO se trataron con TPA, cuantificándose el edema por diferencia de pesada entre las orejas control y las orejas tratadas. Observamos que el grado de edema e hinchamiento fue menor en los animales KO (52% menos) que en los WT (Figura 29A). Además la actividad mieloperoxidasa (MPO) (predominantemente expresada por neutrófilos y monocitos) estaba significativamente disminuida en los ratones KO, lo que

## Resultados

refleja una menor infiltración de leucocitos al tejido afectado (Figura 29B). Para confirmar e ilustrar estos resultados, realizamos cortes del tejido y mediante tinción hematoxilina/eosina (H/E), donde la hematoxilina de Gill (de color azul y naturaleza básica se une a ácidos) tiñe los núcleos celulares y la eosina ácida (de color rojizo que une moléculas básicas) el material citoplasmático, comprobamos que el hinchamiento y la infiltración celular (células del sistema inmune, principalmente granulocitos y mononucleares) eran mucho mayores en los animales WT que en los KO (Figura 29C).

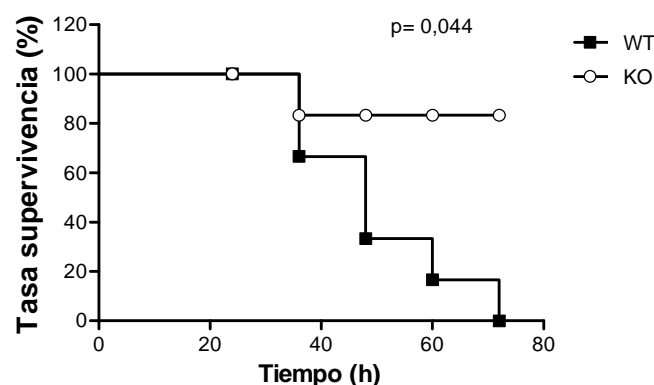


**Figura 29 Respuesta inflamatoria inducida por TPA tópico.** Las orejas de ratones fueron tratadas con TPA (2,5µg) o disolvente (acetona). Tras 4 horas, los animales fueron sacrificados y se cortaron secciones idénticas de oreja. **A)** El peso de las secciones de oreja representa el porcentaje de edema respecto a los WT. **B)** Se determinó la actividad mieloperoxidasa (MPO) en las secciones de oreja. **C)** Tinción de H/E en las secciones de oreja tratada y sin tratar. Los resultados en A y B muestran la media ± D:E. (n=3), \*p<0,05, \*\*p<0,01 respecto a la condición con TPA. La figura C muestra secciones de un experimento representativo.

En resumen, todos estos resultados indican que los ratones que carecen de p19ARF presentan *in vivo* una menor respuesta inflamatoria frente a agentes tóxicos y que las células del sistema inmune innato muestran una deficiente capacidad de infiltración al tejido afectado.

### 11.3 Los animales p19Arf<sup>-/-</sup> son resistentes al choque endotóxico inducido por LPS

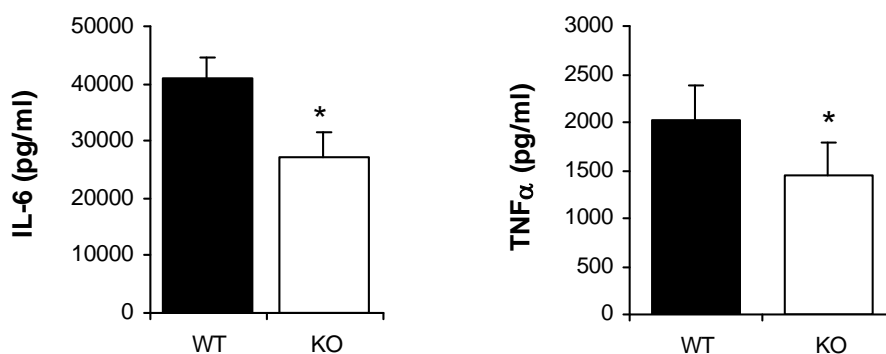
Con el fin de reafirmar la relevancia fisiológica de p19ARF en la regulación de la respuesta inflamatoria en el ratón, decidimos emplear un modelo clásico de inflamación como es provocar un choque séptico administrando LPS intraperitonealmente. Tras la inyección en la cavidad peritoneal de LPS (10 mg/Kg) seguimos la supervivencia de los animales WT y los KO durante 3 días. Como se muestra en la Figura 30, la resistencia al choque endotóxico fue mayor en los animales deficientes en p19Arf con un 83% de supervivencia frente a los animales WT. Además, los animales deficientes para p19Arf dejaron de presentar los signos evidentes de choque séptico una vez superadas las primeras 24 horas tras el tratamiento.



**Figura 30 Supervivencia a choque endotóxico.** Se inyectaron 10 mg/Kg de LPS i.p. y se siguió la supervivencia durante el tiempo indicado. WT (■, n = 7) y p19Arf<sup>-/-</sup> (○, n = 7) para tres experimentos independientes donde p= 0,044.

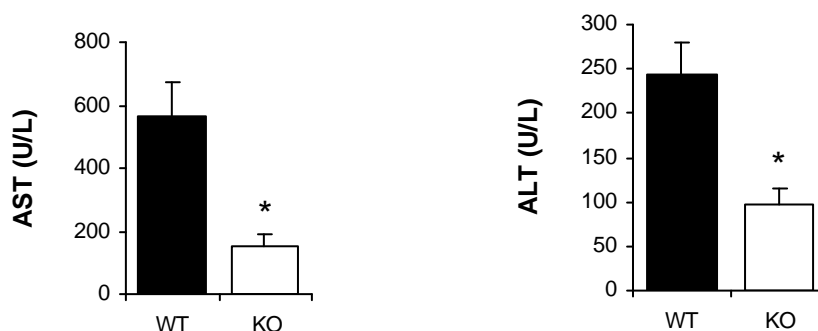
## Resultados

De acuerdo con estos resultados de resistencia a choque séptico, el análisis del suero sanguíneo mostró un ligero descenso en los niveles de citoquinas en los animales KO respecto a los WT a las 2h para el TNF $\alpha$  y 6h en el caso de la IL-6 (Figura 31).



**Figura 31. Citoquinas inflamatorias en sangre.** La citoquina TNF $\alpha$  se midió mediante ensayo ELISA en el plasma de los animales WT y KO tratados LPS 10 mg/Kg i.p. 2 horas después de la inyección; la citoquina IL-6 se midió en plasma recogido a las 6 horas del tratamiento. Los resultados muestran la media  $\pm$  D.E. de 7 animales en cada grupo para tres experimentos independientes, \* $p < 0,05$ .

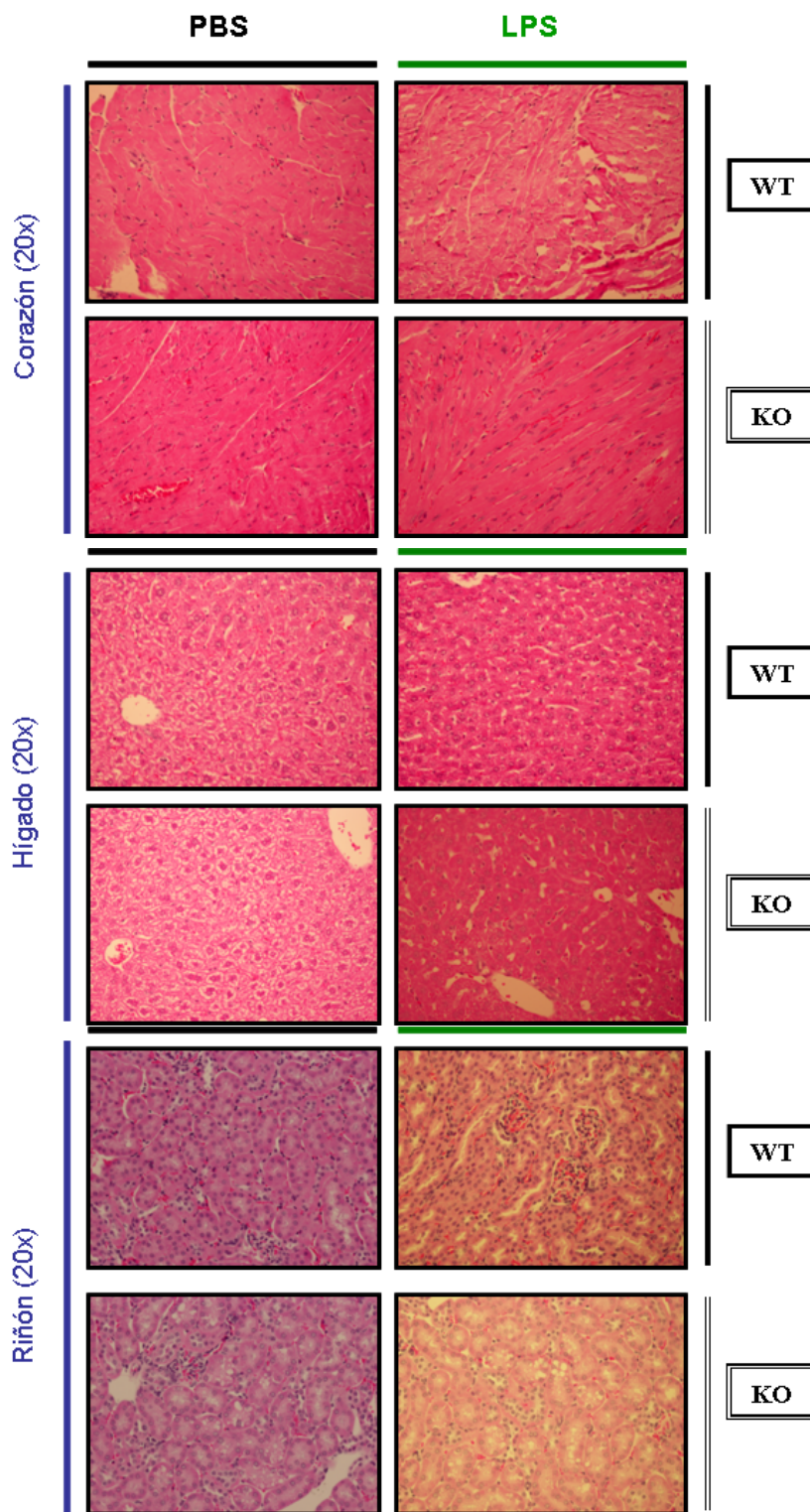
Además confirmando los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo (Zeini *et al.* 2006) comprobamos que el daño hepático que se produce en condiciones de choque séptico era notablemente menor en los animales KO que en los WT. Esto lo pudimos observar al hacer la cuantificación de enzimas de origen hepático en el plasma de los animales tratados i.p. con LPS (Figura 32).



**Figura 32. Daño hepático en choque endotóxico.** Tras 24 horas después del tratamiento con LPS i.p. se recogió el plasma y se midieron los niveles de ALT y AST (Materiales y métodos) en los animales WT y p19Arf $^{-/-}$ . Los resultados muestran la media  $\pm$  D.E. de 7 animales en cada grupo para tres experimentos independientes, \* $p < 0,05$ .



Igualmente analizamos el efecto del daño séptico mediante la realización de análisis histológicos de los órganos vitales de los ratones (Figura 33).



**Figura 33. Cortes histológicos de distintos órganos procedentes del ensayo de choque endotóxico.** Se inyectaron 200µL de PBS o LPS 10 mg/Kg i.p y se recogieron los órganos a las 48h. El corazón y el riñón se prepararon en parafina mientras que el hígado se congeló en OCT (ver “Materiales y métodos”). Todos los tejidos se tiñeron con hematoxilina-eosina. Los resultados muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes con 3 animales en cada grupo. Se muestran imágenes tomadas con el objetivo de 20 aumentos en un microscopio óptico.

## *Resultados*

---

Efectivamente, como se puede apreciar en la Figura 33 los tejidos correspondientes a animales KO tratados con LPS i.p. conservaron mucho mejor las subestructuras celulares lo que demuestra que el daño sufrido fue menor respecto a los animales WT tratados en las mismas condiciones. Esta protección se aprecia sensiblemente más en el tejido cardíaco y el tejido renal.

Si bien estos resultados podrían achacarse al papel pro-apoptótico de ARF por estimulación con NO, en esta protección no podemos descartar la contribución de p19ARF en la activación de la respuesta inflamatoria, siendo esta, como hemos visto en otros modelos, menos exacerbada en los ratones KO.

*Discusión*

---



### ▪ Contextualización y justificación del proyecto

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa que nos protege frente a organismos o sustancias patógenas, reconociéndolas y dificultando su diseminación por el organismo, atacándolas y eliminando las células endógenas dañadas. En este sentido, es capaz incluso de actuar contra las células tumorales (lo que se ha dado en llamar “inmunovigilancia tumoral”). Al mismo tiempo este sistema inmune, en condiciones normales actúa de forma “tolerante” ante los microorganismos simbiotes u otros agentes externos no patógenos. Esta forma tan precisa y regulada de orquestar la defensa inmunitaria hace que las alteraciones genéticas y/o ambientales que provocan desarreglos en la respuesta inmunitaria puedan favorecer, no solo la aparición de infecciones sistémicas, sino múltiples enfermedades como reacciones autoinmunes, inflamaciones crónicas, aterosclerosis e incluso cáncer. De hecho las infecciones y la inflamación descontrolada han sido y son una de las principales causas de muerte a lo largo de toda la historia del ser humano y actualmente mueven un mercado multimillonario para la industria farmacéutica y la investigación básica y aplicada (Nathan 2002). Por eso es fundamental entender con profundidad cuales son los mecanismos moleculares y celulares que gobiernan la activación y regulación del sistema inmune.

Los TLR son los principales receptores de reconocimiento de patógenos en mamíferos y disparan una de las primeras y principales vías de activación del sistema inmune. De su adecuada activación en leucocitos depende en gran medida la capacidad del sistema inmune para producir citoquinas inflamatorias e interferones de tipo I ( $\alpha$  y  $\beta$ ) indispensables en la coordinación de la respuesta innata y la activación del sistema inmune adaptativo. La respuesta inflamatoria que el sistema inmune innato desencadena inmediatamente después de reaccionar con un patógeno o agente irritante se ha estudiado intensamente desde los albores de las ciencias médicas. Hoy en día, gracias al empleo de numerosos modelos animales y celulares sabemos que en esta respuesta intervienen coordinadamente multitud de tipos celulares como monocitos y macrófagos, células cebadas, granulocitos, células endoteliales, células del sistema inmune adaptativo (linfocitos y NK), etc. Uno de los modelos más útiles y recurrentes ha sido el empleo de ligandos de los TLR como el LPS que es uno de los principales componentes de la pared bacteriana de Gram negativas (Cohen 2002; Akira *et al.* 2006). Su empleo en investigación comenzó a generalizarse en los años 60 cuando se comprobó que el pre-tratamiento con LPS podía proteger a los animales contra una infección patógena posterior, lo que se

conocería como “tolerancia a endotoxina” (Poltorak *et al.* 1998). Una de las virtudes de la administración sistémica de LPS puro, libre de endotoxinas, es que, debido a su capacidad para activar “específicamente” TLR4, mimetiza muchas de las características clínicas de la infección por patógenos bacterianos, incluyendo el choque séptico (Opal *et al.* 2002) produciéndose como en este, la activación de leucocitos y endotelio y la liberación por estos de numerosos mediadores pro-inflamatorios. Además la capacidad de activar potentemente la vía de los TLR convierte al LPS en una valiosa molécula para independizar esta ruta y estudiar sus niveles jerárquicos de señalización. En este sentido también se emplean otros ligandos específicos de distintos TLR como el poly(I:C) (para TLR3), el zimosán (para TLR2) o CpG (para TLR9).

Basándonos en el conocido fenómeno de inmuno-vigilancia que el sistema inmune ejerce para prevenir la proliferación de células tumorales y debido a los recientes y cada vez más numerosos descubrimientos que asocian respuesta innata, inflamación, cáncer y supresores tumorales (Kuper *et al.* 2000; Garcia *et al.* 2006; Hold *et al.* 2008; Mantovani *et al.* 2008; Garcia *et al.* 2009; Ren *et al.* 2009) consideramos que el estudio de la proteína ARF en la respuesta inflamatoria estaba bien justificado. Este supresor tumoral se traduce de uno de los locus más frecuentemente mutados o silenciados de los cánceres humanos, el locus Ink4a/Arf (Ruas *et al.* 1998; Harland *et al.* 2005; Sharpless 2005; Gallagher *et al.* 2006). Se trata de una proteína que además se relaciona con senescencia y que presenta muchas particularidades bioquímicas junto con una alta promiscuidad de interacción

En este estudio de tesis doctoral nos hemos servido principalmente de ratones deficientes para ARF y ratones transgénicos del locus Ink4a/Arf y hemos aplicado modelos celulares y animales de la activación del sistema inmune y la ruta de los TLR, nuestros resultados demuestran que ARF resulta necesario para una adecuada activación y señalización inflamatoria a través de TLR en ratones.

- **Supresores tumorales, “vigilantes” del sistema inmune.**

Los denominados supresores tumorales actúan como sensores del estrés oncogénico. Pero además en los últimos tiempos, se ha comenzado a atribuirles nuevas funciones relacionadas con el control de la homeostasis celular y la defensa ante infecciones virales, que en realidad no dejan de constituir estreses potencialmente oncogénicos. Es el caso de p53 para el que se han descrito funciones antivirales. p53 se induce y favorece la apoptosis celular en respuesta a IFN tipo I ( $\alpha$  y  $\beta$ ) e infecciones virales (Takaoka *et al.* 2003). En el

trabajo de Takaoka *et al* se muestra como consecuentemente, la ausencia de p53 acelera la muerte de los animales por infección viral. Además recientemente se ha descubierto que este supresor tumoral es capaz de activar la vía de IFN tipo I favoreciendo la inmunidad innata y la respuesta a virus incluso sin activar la apoptosis de las células infectadas por los virus (Munoz-Fontela *et al.* 2008). En este sentido, también se ha demostrado que p53 es capaz de activar la transcripción de TLR3 en células epiteliales, descubriéndose por primera vez una relación molecular entre un supresor tumoral y los receptores TLR (Taura *et al.* 2008). En este trabajo de Taura *et al* observaron que la activación de la vía de NFκB estaba inhibida en ausencia de p53 tras inducción con poly(I:C). Esta observación entra sin embargo, en conflicto con la idea más generalizada, de que p53 actúa inhibiendo la respuesta inflamatoria y más concretamente la vía de NFκB y la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Ravi *et al.* 1998; Komarova *et al.* 2005; Zheng *et al.* 2005; Liu, G. *et al.* 2009a). Si bien hemos de tener en cuenta que esta actividad anti-inflamatoria de p53 está relacionada con su función anti-tumoral, ya que se considera que en estas condiciones p53 serviría como freno fisiológico a la inflamación crónica, que favorece la aparición de cáncer (Kuper *et al.* 2000), y a la desregulación de NFκB, que provoca resistencia a la apoptosis (Rayet *et al.* 1999).

La proteína retinoblastoma (RB) es otro supresor tumoral al que recientemente se le han atribuido funciones anti-virales Garcia *et al.* 2009. Al igual que en las observaciones de Taura *et al* para p53, en ausencia del supresor de ciclo celular RB, el grupo de Garcia observó que la vía de NFκB estaba afectada y que IκBα no se degradaba adecuadamente, por lo que la infección viral podía avanzar evadiendo la respuesta inmune (Garcia *et al.* 2009).

Teniendo estos datos en cuenta, no es descabellado pensar que otros supresores tumorales como ARF pueden ser también importantes reguladores de la respuesta inmune.

#### ▪ Senescencia e inflamación

Una característica de ARF que quizás podría también contribuir a ayudarnos a entender su papel en la respuesta inflamatoria es su participación en senescencia. Aunque no se conoce bien su función en este proceso biológico, se sabe que ARF aumenta su expresión en células senescentes de ratón (Zindy *et al.* 1998) y sin ella, las células murinas, pueden evadir este mecanismo de control de la proliferación (Kamijo *et al.* 1997; Randle *et al.* 2001), por lo que se considera que tiene un papel pro-senescente en células en cultivo.

Por otro lado, recientemente se ha comprobado que para el correcto mantenimiento de las células senescentes estas necesitan expresar un fenotipo claramente pro-inflamatorio (llamado SASP, *Senescence-Associated Secretory Phenotype*) (Coppe *et al.* 2008). Teniendo en cuenta estas dos características tal vez no sea temerario considerar que ARF pueda tener un papel importante en la regulación de este fenotipo. De hecho, se considera que las citoquinas inflamatorias pueden suprimir las fases iniciales de la tumorigénesis mediando senescencia (Ren *et al.* 2009) lo que lo relaciona todavía más con el papel fisiológico anti-tumoral de ARF. Esta idea podemos relacionarla con el hecho de que los animales deficientes en citoquinas activadoras del sistema inmunitario como el IFN $\gamma$  son más propensos a desarrollar tumores (Shankaran *et al.* 2001) o que las inmunodeficiencias se asocian con una mayor prevalencia de cáncer (Andres 2005; Vallejo *et al.* 2005). Aunque no debemos olvidar que este papel anti-tumoral temprano del fenotipo inflamatorio se opone a su función potenciadora de los tumores en condiciones crónicas, por lo que es evidente que el equilibrio entre ambos sistemas es sumamente delicado y complejo.

### ▪ Análisis de los resultados

Los resultados expuestos en este trabajo demuestran tanto *in vitro* como *in vivo* que ARF es necesario para que se pueda producir una adecuada respuesta inmunitaria. Esta conclusión es inferida del análisis, en líneas primarias macrofágicas de ratones WT y deficientes para p19Arf, del estado de la vías de señalización de NF $\kappa$ B y de las MAPKs junto con la cuantificación de las señales inflamatorias “*downstream*” de estas vías (producción de citoquinas pro-inflamatorias, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6, anti-inflamatorias como IL-10 y mediadores pro-inflamatorios como NOS-2 y COX-2), tanto a nivel transcripcional como de expresión proteica. Además hemos comprobado que de forma directa o indirecta p19ARF es necesaria para mantener la adecuada capacidad de adhesión de los macrófagos activados por estímulo inflamatorio.

Estos resultados *in vitro* fueron corroborados en sistemas *in vivo* mediante la utilización de tres modelos distintos de inflamación en ratón (peritonitis aguda por tioglicolato, inducción de edema cutáneo por TPA y choque séptico por inyección intraperitoneal de LPS).

La regulación de todas estas vías ejercida por p19ARF podría deberse al control de la transcripción de los receptores TLR, que por primera vez se ha demostrado que es



dependiente de este supresor tumoral en respuesta a estímulos inflamatorios y en condiciones basales. Además esta regulación es ejercida por p19ARF de una forma independiente a p53.

La aparente falta de activación de la vía de NFκB y el perfil anti-inflamatorio detectado en los macrófagos carentes de p19ARF nos llevó a interesarnos más en detalle por el estudio de la polarización de estos macrófagos, es decir, por su perfil M1-M2 que en los últimos años está suscitando un intenso debate (Gordon 2003; Van Ginderachter *et al.* 2006; Benoit *et al.* 2008; Martinez *et al.* 2009). Sin embargo, como hemos visto los resultados no nos permiten concluir que p19ARF tenga un papel determinante en la configuración de estos perfiles. Quizás este planteamiento inicial haya sido ingenuo ya que la polarización M1-M2 es un continuo de patrones de expresión altamente dependiente del contexto celular y sujeto a finos equilibrios de activación-inhibición por cócteles de citoquinas y otras moléculas señalizadoras. Por lo tanto, es difícil pensar que la ausencia de una sola proteína puede decantar completamente la balanza de un extremo al otro de este continuo fenotípico. A esto hay que añadir el hecho de que debemos reconocer las limitaciones del sistema de los BMDM, ya que se ha demostrado que la inducción con M-CSF puede promocionar el perfil M2 (Martinez *et al.* 2006). Sin embargo, la hipótesis de que los macrófagos que carecen de p19ARF tiendan a presentar un fenotipo no tanto M2 sino semejante al de los macrófagos asociados con tumores (TAM) sería una hipótesis que contribuiría a dar un papel todavía más importante a p19ARF en el control del cáncer. Y ayudaría también a explicar fenotipos donde los nódulos linfáticos de los papilomas de animales deficientes en p19Arf muestran mayor acumulación de macrófagos y linfocitos B que los de animales WT (inducidos con DMBA) (Ruddell *et al.* 2008).

En el análisis de los resultados, especialmente los que se refieren a sistemas *in vivo*, no podemos olvidar la contribución de la actividad pro-apoptótica de p19ARF. Así por ejemplo, no podemos obviar la posibilidad de que, en el contexto de la respuesta inflamatoria, los neutrófilos p19Arf KO sufran menos apoptosis que en los animales WT. La apoptosis de neutrófilos favorece la activación de los macrófagos y la eliminación por fagocitosis de los neutrófilos muertos (Serhan *et al.* 2005). Por tanto, quizás en el fenotipo de activación que observamos de células extravasadas al peritoneo, no debemos descartar que la ausencia de apoptosis pueda estar contribuyendo en la menor activación macrofágica. En este sentido, sería interesante en futuras investigaciones comprobar efectivamente el estado apoptótico de los neutrófilos.

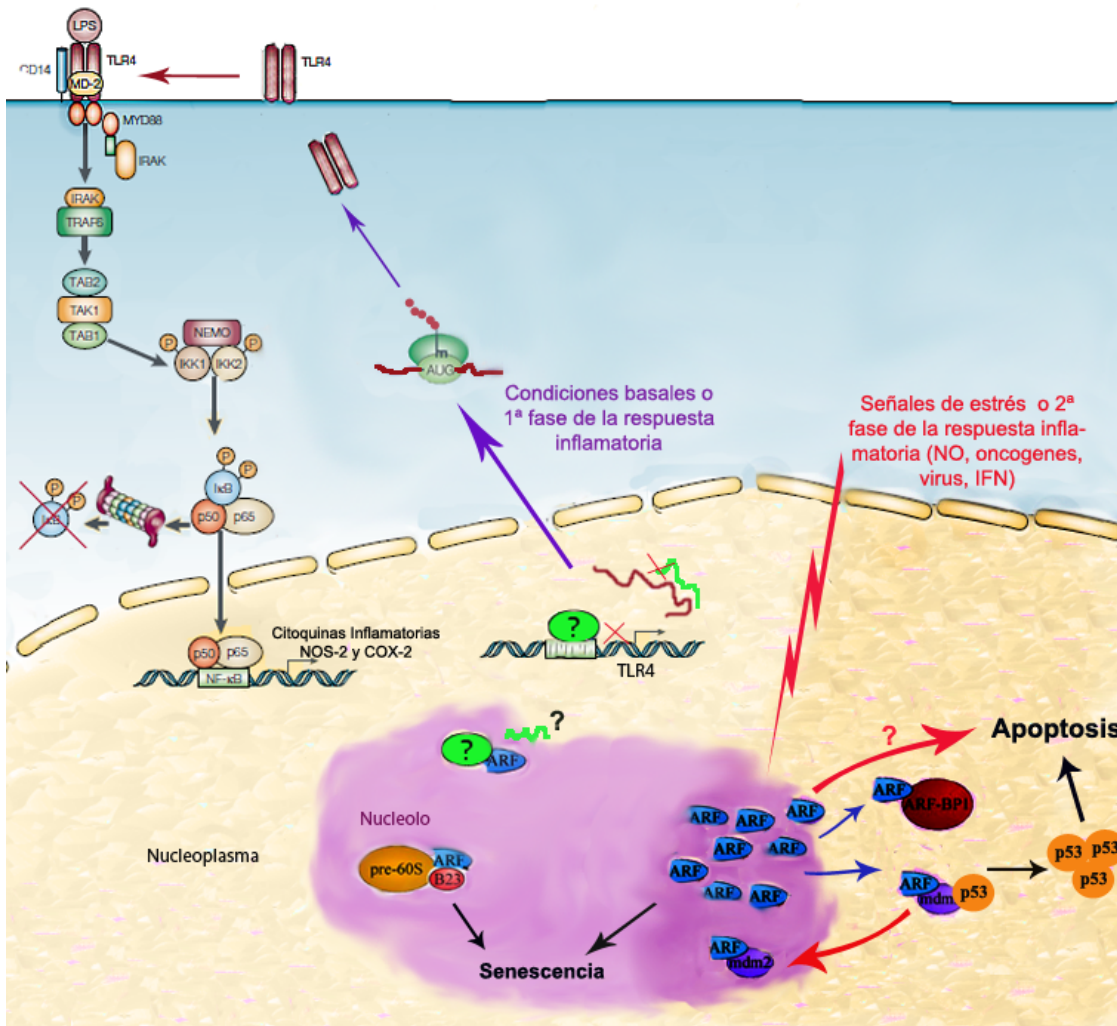
Respecto al papel de p16Ink4a, el gen que comparte el locus con p19Arf, los resultados muestran que no tiene un papel relevante en el control de la respuesta inflamatoria en nuestro sistema. Esto lo hemos demostrado mediante el empleo de dos estrategias complementarias, el uso de células que sobre-expresan el locus p16Ink4a/Arf y la sobre-expresión de p19ARF en las células deficientes para la misma que consigue recuperar el fenotipo WT.

### ▪ Hipótesis y modelo propuestos

A la vista de nuestros resultados, argumentamos que p19ARF podría ser un nuevo supresor tumoral con un papel relevante en respuesta inmunitaria. Nuestra hipótesis se apoya en documentos previos que describen que su expresión está activada por IFN tipo I y por virus (Ries *et al.* 2000; Sandoval *et al.* 2004). Esta idea se vio reforzada cuando el grupo de Serrano en el año 2006 (García *et al.* 2006) consiguió demostrar que p19ARF era capaz de proteger a las células y a los ratones de la infección viral. Además demostraron que esta función defensiva de p19ARF era independiente de p53. Todos estos trabajos demuestran, por primera vez, que p19ARF es necesaria para el control de la respuesta ante patógenos y que actúa como sensor de agresiones externas, sumando así una nueva función independiente a su principal pareja de señalización anti-tumoral.

En este sentido, son remarcables las múltiples funciones independientes de p53 que en los últimos tiempos se han atribuido a ARF: control ribosomal, sumoilación, inhibición de la actividad utiquitín-ligasa... (Weber *et al.* 2000) y sobre las que todavía quedan muchos interrogantes por resolver acerca de su función fisiológica. Sin duda, abren posibles mecanismos que puedan servir para explicar parte de nuestros descubrimientos, ya que algunas de estas funciones, como el control de la homeostasis nucleolar (Apicelli *et al.* 2008) y la regulación de la sumoilación (Tago *et al.* 2005) se sabe que pueden ser llevadas a cabo por ARF incluso a bajísimos niveles de expresión, en condiciones basales y en interfase celular. Otro campo que podría despejar muchas incógnitas en este sentido, es el de los microRNAs. El carácter básico de ARF, su presencia en el nucleolo y su demostrada regulación a través de microRNAs (Mudhasani *et al.* 2008) junto con las recientes investigaciones que han empezado a relacionar a este particular tipo de RNAs con la regulación de la respuesta inflamatoria (Schetter *et al.* ), convierte a estas moléculas en buenas candidatas a participar en el control de la respuesta inflamatoria junto a ARF y creemos que merecería el esfuerzo de llevar a cabo nuevas investigaciones en este área.

El modelo de “dos fases” propuesto por Munoz-Fontela *et al.* en 2008 plantea que el supresor tumoral p53 podría estar actuando en dos etapas ante la infección viral: primero activando la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias IFN tipo I y probablemente otros genes relacionados, lo que sería importante en las fases tempranas de contacto con la infección. En la segunda fase, p53 podría ayudar a evitar la replicación vírica mediante la inducción de la apoptosis de las propias células infectadas. Este modelo se ajusta sin duda, a las observaciones realizadas por nuestro grupo en este trabajo de tesis y en trabajos anteriores (Zeini *et al.* 2006) respecto a la actuación del supresor tumoral p19ARF en respuesta a estímulos de origen bacteriano (ver modelo en la Ilustración I). En este caso, p19ARF actuaría permitiendo una correcta activación de la respuesta inflamatoria en los primeros contactos con los patógenos, tal y como hemos observado en la activación de macrófagos (una de las primeras células en contactar con los patógenos) por LPS. En una segunda fase, cuando la infección bacteriana es más potente y se han activado células del sistema inmune adaptativo, la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IFN $\gamma$  unido al contacto con los PAMP como el LPS son capaces de activar notablemente la expresión de p19ARF que lleva a la activación de la apoptosis dependiente e independiente de p53 (Zeini *et al.* 2006). En este sentido, el hecho de que p19ARF no se induzca de manera notable por efecto de la activación por TLR puede ayudar a evitar efectos adversos en las células macrófágicas, ya que si aumentase considerablemente su expresión se podría activar a p53 y acabar en una apoptosis indeseada en la fase de iniciación de la respuesta inflamatoria.



**Ilustración I. Modelo propuesto de “dos fases” respecto a las funciones de p19ARF en la respuesta inflamatoria.**

No debemos olvidar, que en una infección por un microorganismo completo se disparan otras muchas vías de señalización que activan de múltiples formas todo el sistema inmune. En los casos más graves, en los que el sistema inmune no es capaz de eliminar al agente infeccioso, aquel acabará por ser superado y la infección se extenderá hasta provocar la muerte del animal al afectar a sus órganos vitales. En el caso del modelo de choque séptico por inyección intraperitoneal de LPS, la muerte de los animales se produce por un exceso de activación del sistema inmune que acaba por destruir estos órganos vitales. Por eso, nuestro pronóstico es que la deficiencia en p19ARF hará a los animales menos resistentes a las infecciones por microorganismos vivos. Esto sería lo previsible ya que la señalización a través de los TLR y la migración de las células del sistema inmune están disminuidas, de

modo que los microorganismos patógenos se enfrentarían a un sistema inmunitario ineficaz y tendrían más probabilidades de éxito para invadir y atacar a los animales. Esto estaría en consonancia con los resultados de Garcia *et al.* en 2006 en los que observan que la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  está reducida en los animales deficientes para p19Arf, siendo aquí también, igual que en nuestro sistema, un mecanismo independiente de p53.

Los trabajos realizados por Rocha *et al.* (Rocha *et al.* 2003; Rocha *et al.* 2005) demuestran que p14ARF es capaz de reprimir la activación de NF $\kappa$ B de una manera independiente de p53 y MDM2. El sistema celular y fisiológico empleado por este estudio, difiere significativamente del empleado en nuestro trabajo, ya que Rocha utiliza bien células humanas procedentes de osteosarcoma o bien células murinas MEFs activadas con un estímulo fuertemente oncogénico (Bcr-Abl). En ambos sistemas, las vías de regulación de ciclo están claramente alteradas y difieren notablemente del nuestro, basado, como hemos visto, en cultivos primarios no inmortalizados donde el ciclo celular está altamente reprimido. La conclusión de Rocha por tanto, no es que ARF intervenga en la represión de NF $\kappa$ B en cuanto a su papel pro-inflamatorio, sino, en su papel proliferativo y oncogénico. De hecho, observa como su estímulo de elección para activar la vía de NF $\kappa$ B, el TNF $\alpha$ , disminuye la actividad de p53 en sus células y provoca apoptosis de forma independiente a p53, situación que como hemos visto en nuestros resultados es totalmente opuesta cuando estimulamos con ligandos de TLR.

Es cierto que la activación de NF $\kappa$ B en las células inflamatorias promueve el desarrollo tumoral (Karin 2006), sin embargo, creemos que nuestros resultados pueden ser consistentes con esta idea, ya que nuestro modelo animal se ciñe a las primeras semanas de vida de los animales (10 semanas máximo), cuando los animales deficientes para p19Arf todavía no han desarrollado tumores, por lo tanto, aquí NF $\kappa$ B todavía no habría adquirido una función promotora de tumores. Esto está de acuerdo con trabajos previos donde se sostiene que NF $\kappa$ B no participa en las fases tempranas pre-malignas de desarrollo tumoral (Pikarsky *et al.* 2004).

No sería de extrañar que se siguiesen descubriendo nuevas funciones biológicas de ARF, de hecho, recientemente han aparecido algunos trabajos donde incluso se atribuyen funciones pro-tumorales a esta proteína (Humbey *et al.* 2008; Chen *et al.* 2009). En estos trabajos se concluye que esta sorprendente nueva función de ARF es altamente dependiente del tipo celular y del ambiente o estrés metabólico de las células tumorales.

Estos aparentes conflictos surgidos de distintos trabajos en los que se atribuyen funciones casi opuestas a ARF podrían venir en parte también, por el hecho de que debido a la bajísima expresión de ARF endógeno en condiciones basales, se ha tenido la necesidad experimental de emplear sistemas de sobre-expresión artificial que, en ciertos casos, podría estar forzando las múltiples interacciones fisiológicas o incluso ocasionar uniones inespecíficas con otras moléculas debido a su naturaleza altamente básica, con la consiguiente dificultad de interpretación de datos (den Besten *et al.* 2006) y que nos obliga a mejorar nuestros abordajes experimentales.

### ▪ Implicaciones del trabajo

Este trabajo se ha basado en el estudio de p19ARF en células del sistema inmune, concretamente en las células mieloides. En este sentido, nuestros descubrimientos aportan nueva información acerca del estado y regulación de este gen clave en la activación de las células del sistema inmunitario. Estas observaciones se unen a otras que recientemente han demostrado la importancia de este locus Ink4a/Arf en los distintos tipos celulares del sistema inmune (Akala *et al.* 2008; Liu, Y. *et al.* 2009b). También podemos vincularlo a la reciente asociación entre la deficiencia de expresión del locus Ink4a/Arf en los linfocitos T y un mayor riesgo de padecer enfermedad aterosclerótica (Liu, Y. *et al.* 2009b), enfermedad altamente relacionada con el fino control de la inflamación y la apoptosis (Hansson *et al.* 2006). Según este modelo de Liu, p16INK4a y p14ARF podrían trabajar coordinadamente para modular las fases tempranas de la aterosclerosis.

Así mismo este papel protector, que sugerimos para p19ARF ante las infecciones podría relacionarse con las observaciones de Matheu *et al.* 2007 (datos suplementarios) donde muestran que los animales transgénicos “super Ink4a/Arf/Ink4b” muestran una ligera tendencia a padecer menos enfermedades inflamatorias (aunque los autores no lo consideren significativo).

El hecho de que los animales deficientes en p19Arf tengan una respuesta inflamatoria disminuida podría favorecer la aparición de tumores descrita en estos animales (Kamijo *et al.* 1999), ya que su inmuno-vigilancia estaría mermada, de modo que las células tumorales originadas por la deficiencia en la vía ARF-p53 tendrían muchas más facilidades para expandirse y metastatizar contribuyendo así al amplio espectro de cánceres espontáneos e inducidos que presentan estos animales. En este sentido, teniendo en cuenta esta nueva función de p19ARF, no sería desdeñable reconsiderar el estado de activación de esta

proteína en los modelos donde p53 actúa como inhibidor de la inflamación, ya que como se ha descrito (y como nosotros mismos hemos constatado en los MEFs deficientes para p53) la ausencia de p53 en los ratones KO provoca el aumento de la expresión de p19ARF (Robertson *et al.* 1998; Stott *et al.* 1998) lo que podría estar favoreciendo la activación de la respuesta inflamatoria.

Aunque son considerables las diferencias que existen en la expresión, regulación y probable funcionalidad de ARF entre ratones y humanos (Sharpless 2004; Sharpless 2005), ya que por ejemplo, las mutaciones o deleciones que afectan exclusivamente a Arf son poco frecuentes en humanos, es posible que a la vista de nuestros resultados y los de otros (Garcia *et al.* 2006) no debiéramos subestimar a partir de ahora el efecto que ARF pudiera tener en la regulación de la inflamación en los seres humanos. Por eso podríamos sugerir la recomendación de aumentar la investigación en este campo en pacientes con enfermedades relacionadas con inmunidad y tener también en cuenta esta característica a la hora de tratar a los pacientes con deleciones o silenciamientos en Arf donde la incidencia del factor inflamatorio podría estar modulando la evolución de los tumores debidos a la desregulación de p14Arf.





*Conclusiones*

---



Las principales conclusiones que podemos extraer de los resultados obtenidos con este trabajo son:

1. La ausencia de p19ARF en macrófagos peritoneales y derivados de médula ósea provoca la disminución de la producción de mediadores inflamatorios (citoquinas y enzimas inducibles) tras estimulación con ligandos de TLR.
2. p19ARF es indispensable para la correcta señalización a través de la vía de NFκB y MAPKs por activación con LPS y poly(I:C). Esta regulación debe, al menos en parte, a que p19ARF es necesaria para la correcta regulación de la expresión de los receptores TLR2 y TLR4 en macrófagos murinos. p19ARF ejerce estos efectos de una forma independiente a p53.
3. p19ARF es necesaria para permitir la adecuada expresión de marcadores de superficie pro-inflamatorios de distintas líneas mieloides. Además es indispensable en la activación de la adhesión de macrófagos peritoneales sobre sustratos proteicos y células endoteliales.
4. La ausencia de p19ARF reduce significativamente el grado de inflamación aguda sufrida por los ratones en tres modelos experimentales distintos:
  - p19ARF es necesaria para la adecuada migración de poblaciones leucocitarias en el modelo de peritonitis por inyección de tioglicolato.
  - p19ARF es necesaria para la activación y extravasación de leucocitos al foco de inflamación en el modelo de aplicación tópica de TPA.
  - La ausencia de p19ARF aumenta la supervivencia a choque endotóxico (inyección intraperitoneal de LPS) al disminuir el grado de inflamación sistémica provocada por el mismo.



## *Bibliografía*

---



- Akala, O. O., Park, I. K., Qian, D., Pihalja, M., Becker, M. W. and Clarke, M. F. (2008). "Long-term haematopoietic reconstitution by Trp53<sup>-/-</sup>-p16Ink4a<sup>-/-</sup>-p19Arf<sup>-/-</sup> multipotent progenitors." *Nature* 453(7192): 228-32.
- Akira, S. and Takeda, K. (2004). "Toll-like receptor signalling." *Nat Rev Immunol* 4(7): 499-511.
- Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* 124(4): 783-801.
- Ambs, S., Ogunfusika, M. O., Merriam, W. G., Bennett, W. P., Billiar, T. R. and Harris, C. C. (1998). "Up-regulation of inducible nitric oxide synthase expression in cancer-prone p53 knockout mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15): 8823-8.
- Andres, A. (2005). "Cancer incidence after immunosuppressive treatment following kidney transplantation." *Crit Rev Oncol Hematol* 56(1): 71-85.
- Apicelli, A. J., Maggi, L. B., Jr., Hirbe, A. C., Miceli, A. P., Olanich, M. E., Schulte-Winkeler, C. L., Saporita, A. J., Kuchenreuther, M., Sanchez, J., Weilbaecher, K. and Weber, J. D. (2008). "A non-tumor suppressor role for basal p19ARF in maintaining nucleolar structure and function." *Mol Cell Biol* 28(3): 1068-80.
- Ayrault, O., Andrique, L., Larsen, C. J. and Seite, P. (2004). "Human Arf tumor suppressor specifically interacts with chromatin containing the promoter of rRNA genes." *Oncogene* 23(49): 8097-104.
- Baker, D. J., Perez-Terzic, C., Jin, F., Pitel, K., Niederlander, N. J., Jeganathan, K., Yamada, S., Reyes, S., Rowe, L., Hiddinga, H. J., Eberhardt, N. L., Terzic, A. and van Deursen, J. M. (2008). "Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency." *Nat Cell Biol* 10(7): 825-36.
- Balkwill, F. (2002). "Tumor necrosis factor or tumor promoting factor?" *Cytokine Growth Factor Rev* 13(2): 135-41.
- Bannenberg, G. L., Chiang, N., Ariel, A., Arita, M., Tjonahen, E., Gotlinger, K. H., Hong, S. and Serhan, C. N. (2005). "Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins." *J Immunol* 174(7): 4345-55.
- Barreiro, O., Yanez-Mo, M., Sala-Valdes, M., Gutierrez-Lopez, M. D., Ovalle, S., Higginbottom, A., Monk, P. N., Cabanas, C. and Sanchez-Madrid, F. (2005). "Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation." *Blood* 105(7): 2852-61.
- Bates, S., Phillips, A. C., Clark, P. A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R. L. and Vousden, K. H. (1998). "p14ARF links the tumour suppressors RB and p53." *Nature* 395(6698): 124-5.
- Benoit, M., Desnues, B. and Mege, J. L. (2008). "Macrophage polarization in bacterial infections." *J Immunol* 181(6): 3733-9.

Bertwistle, D., Sugimoto, M. and Sherr, C. J. (2004). "Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23." *Mol Cell Biol* 24(3): 985-96.

Beutler, B. and Rietschel, E. T. (2003). "Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin." *Nat Rev Immunol* 3(2): 169-76.

Beutler, B. A. (2009). "TLRs and innate immunity." *Blood* 113(7): 1399-407.

Bookout, A. L. and Mangelsdorf, D. J. (2003). "Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways." *Nucl Recept Signal* 1: e012.

Bracken, A. P., Kleine-Kohlbrecher, D., Dietrich, N., Pasini, D., Gargiulo, G., Beekman, C., Theilgaard-Monch, K., Minucci, S., Porse, B. T., Marine, J. C., Hansen, K. H. and Helin, K. (2007). "The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells." *Genes Dev* 21(5): 525-30.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.

Brady, S. N., Yu, Y., Maggi, L. B., Jr. and Weber, J. D. (2004). "ARF impedes NPM/B23 shuttling in an Mdm2-sensitive tumor suppressor pathway." *Mol Cell Biol* 24(21): 9327-38.

Carlson, R. P., O'Neill-Davis, L., Chang, J. and Lewis, A. J. (1985). "Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents." *Agents Actions* 17(2): 197-204.

Carmody, R. J. and Chen, Y. H. (2007). "Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling." *Cell Mol Immunol* 4(1): 31-41.

Chen, D., Kon, N., Li, M., Zhang, W., Qin, J. and Gu, W. (2005). "ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor." *Cell* 121(7): 1071-83.

Chen, M., Capps, C., Willerson, J. T. and Zoldhelyi, P. (2002). "E2F-1 regulates nuclear factor-kappaB activity and cell adhesion: potential antiinflammatory activity of the transcription factor E2F-1." *Circulation* 106(21): 2707-13.

Chen, Z., Carracedo, A., Lin, H. K., Koutcher, J. A., Behrendt, N., Egia, A., Alimonti, A., Carver, B. S., Gerald, W., Teruya-Feldstein, J., Loda, M. and Pandolfi, P. P. (2009). "Differential p53-independent outcomes of p19(Arf) loss in oncogenesis." *Sci Signal* 2(84): ra44.

Classon, M. and Harlow, E. (2002). "The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer." *Nat Rev Cancer* 2(12): 910-7.

Cohen, J. (2002). "The immunopathogenesis of sepsis." *Nature* 420(6917): 885-91.

Collart, M. A., Baeuerle, P. and Vassalli, P. (1990). "Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B." *Mol Cell Biol* 10(4): 1498-506.



- Conrad, R. E., Yang, L. C. and Herscowitz, H. B. (1977). "Mononuclear phagocytic cells in peritoneal exudates of rabbits: a comparison of inducing agents." *J Reticuloendothel Soc* 21(2): 103-7.
- Coppe, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Munoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P. Y. and Campisi, J. (2008). "Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor." *PLoS Biol* 6(12): 2853-68.
- David-Pfeuty, T. and Nouvian-Dooghe, Y. (2002). "Human p14(Arf): an exquisite sensor of morphological changes and of short-lived perturbations in cell cycle and in nucleolar function." *Oncogene* 21(44): 6779-90.
- de Stanchina, E., McCurrach, M. E., Zindy, F., Shieh, S. Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A. V., Prives, C., Roussel, M. F., Sherr, C. J. and Lowe, S. W. (1998). "E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor." *Genes Dev* 12(15): 2434-42.
- den Besten, W., Kuo, M. L., Tago, K., Williams, R. T. and Sherr, C. J. (2006). "Ubiquitination of, and sumoylation by, the Arf tumor suppressor." *Isr Med Assoc J* 8(4): 249-51.
- Den Otter, W., De Groot, J. W., Van Basten, C. D., Rademakers, L. H., De Weger, R. A. and Pels, E. (1982). "Brewer thioglycollate medium induces different exudates in guinea pigs and mice." *Exp Mol Pathol* 36(3): 403-13.
- DiGiammarino, E. L., Filippov, I., Weber, J. D., Bothner, B. and Kriwacki, R. W. (2001). "Solution structure of the p53 regulatory domain of the p19Arf tumor suppressor protein." *Biochemistry* 40(8): 2379-86.
- Dimri, G. P., Itahana, K., Acosta, M. and Campisi, J. (2000). "Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor." *Mol Cell Biol* 20(1): 273-85.
- Duro, D., Bernard, O., Della Valle, V., Berger, R. and Larsen, C. J. (1995). "A new type of p16INK4/MTS1 gene transcript expressed in B-cell malignancies." *Oncogene* 11(1): 21-9.
- Efeyan, A. and Serrano, M. (2007). "p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes." *Cell Cycle* 6(9): 1006-10.
- El-Omar, E. M., Carrington, M., Chow, W. H., McColl, K. E., Bream, J. H., Young, H. A., Herrera, J., Lissowska, J., Yuan, C. C., Rothman, N., Lanyon, G., Martin, M., Fraumeni, J. F., Jr. and Rabkin, C. S. (2000). "Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer." *Nature* 404(6776): 398-402.
- Eymin, B., Leduc, C., Coll, J. L., Brambilla, E. and Gazzeri, S. (2003). "p14ARF induces G2 arrest and apoptosis independently of p53 leading to regression of tumours established in nude mice." *Oncogene* 22(12): 1822-35.
- Forrester, K., Ambs, S., Lupold, S. E., Kapust, R. B., Spillare, E. A., Weinberg, W. C., Felley-Bosco, E., Wang, X. W., Geller, D. A., Tzeng, E., Billiar, T. R. and Harris, C. C. (1996). "Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(6): 2442-7.

- Fujihara, M., Muroi, M., Tanamoto, K., Suzuki, T., Azuma, H. and Ikeda, H. (2003). "Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex." *Pharmacol Ther* 100(2): 171-94.
- Gallagher, S. J., Kefford, R. F. and Rizos, H. (2006). "The ARF tumour suppressor." *Int J Biochem Cell Biol* 38(10): 1637-41.
- Ganguli, G. and Wasylyk, B. (2003). "p53-independent functions of MDM2." *Mol Cancer Res* 1(14): 1027-35.
- Garcia, M. A., Collado, M., Munoz-Fontela, C., Matheu, A., Marcos-Villar, L., Arroyo, J., Esteban, M., Serrano, M. and Rivas, C. (2006). "Antiviral action of the tumor suppressor ARF." *Embo J* 25(18): 4284-92.
- Garcia, M. A., Gallego, P., Campagna, M., Gonzalez-Santamaria, J., Martinez, G., Marcos-Villar, L., Vidal, A., Esteban, M. and Rivas, C. (2009). "Activation of NF- $\kappa$ B pathway by virus infection requires Rb expression." *PLoS One* 4(7): e6422.
- Gil, J., Alcami, J. and Esteban, M. (1999). "Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-kappaB." *Mol Cell Biol* 19(7): 4653-63.
- Gil, J. and Peters, G. (2006). "Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(9): 667-77.
- Giron, N., Traves, P. G., Rodriguez, B., Lopez-Fontal, R., Bosca, L., Hortelano, S. and de las Heras, B. (2008). "Suppression of inflammatory responses by labdane-type diterpenoids." *Toxicol Appl Pharmacol* 228(2): 179-89.
- Glass, C. K. and Ogawa, S. (2006). "Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity." *Nat Rev Immunol* 6(1): 44-55.
- Gonzalez, S., Klatt, P., Delgado, S., Conde, E., Lopez-Rios, F., Sanchez-Cespedes, M., Mendez, J., Antequera, F. and Serrano, M. (2006). "Oncogenic activity of Cdc6 through repression of the INK4/ARF locus." *Nature* 440(7084): 702-6.
- Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." *Nat Rev Immunol* 3(1): 23-35.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. (1982). "Analysis of nitrate, nitrite, and [ $^{15}\text{N}$ ]nitrate in biological fluids." *Anal Biochem* 126(1): 131-8.
- Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M. and Harris, C. C. (1994). "Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis." *Cancer Res* 54(18): 4855-78.
- Groth, A., Weber, J. D., Willumsen, B. M., Sherr, C. J. and Roussel, M. F. (2000). "Oncogenic Ras induces p19ARF and growth arrest in mouse embryo fibroblasts lacking p21Cip1 and p27Kip1 without activating cyclin D-dependent kinases." *J Biol Chem* 275(35): 27473-80.

- Hagemann, T., Biswas, S. K., Lawrence, T., Sica, A. and Lewis, C. E. (2009). "Regulation of macrophage function in tumors: the multifaceted role of NF-kappaB." *Blood* 113(14): 3139-46.
- Hansson, G. K., Robertson, A. K. and Soderberg-Naucler, C. (2006). "Inflammation and atherosclerosis." *Annu Rev Pathol* 1: 297-329.
- Harland, M., Taylor, C. F., Chambers, P. A., Kukalich, K., Randerson-Moor, J. A., Gruis, N. A., de Snoo, F. A., ter Huurne, J. A., Goldstein, A. M., Tucker, M. A., Bishop, D. T. and Bishop, J. A. (2005). "A mutation hotspot at the p14ARF splice site." *Oncogene* 24(28): 4604-8.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. and Oren, M. (1997). "Mdm2 promotes the rapid degradation of p53." *Nature* 387(6630): 296-9.
- Henderson, R. B., Hobbs, J. A., Mathies, M. and Hogg, N. (2003). "Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration." *Blood* 102(1): 328-35.
- Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabet, K., Kim, S. O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Han, J. and Beutler, B. (2003). "Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling." *Nature* 424(6950): 743-8.
- Hoebe, K., Janssen, E. M., Kim, S. O., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., Han, J. and Beutler, B. (2003). "Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways." *Nat Immunol* 4(12): 1223-9.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. and Ezekowitz, R. A. (1999). "Phylogenetic perspectives in innate immunity." *Science* 284(5418): 1313-8.
- Hold, G. L. and El-Omar, E. M. (2008). "Genetic aspects of inflammation and cancer." *Biochem J* 410(2): 225-35.
- Honda, R. and Yasuda, H. (1999). "Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53." *Embo J* 18(1): 22-7.
- Hopkins, P. A. and Sriskandan, S. (2005). "Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond." *Clin Exp Immunol* 140(3): 395-407.
- Hortelano, S., Lopez-Collazo, E. and Bosca, L. (1999). "Protective effect of cyclosporin A and FK506 from nitric oxide-dependent apoptosis in activated macrophages." *Br J Pharmacol* 126(5): 1139-46.
- Hosoe, S., Ogura, T., Hayashi, S., Komuta, K., Ikeda, T., Shirasaka, T., Kawase, I., Masuno, T. and Kishimoto, S. (1989). "Induction of tumoricidal macrophages from bone marrow cells of normal mice or mice bearing a colony-stimulating-factor-producing tumor." *Cancer Immunol Immunother* 28(2): 116-22.
- Humbey, O., Pimkina, J., Zilfou, J. T., Jarnik, M., Dominguez-Brauer, C., Burgess, D. J., Eischen, C. M. and Murphy, M. E. (2008). "The ARF tumor suppressor can promote the progression of some tumors." *Cancer Res* 68(23): 9608-13.

- Hume, D. A. (2008). "Macrophages as APC and the dendritic cell myth." *J Immunol* 181(9): 5829-35.
- Imhof, B. A. and Aurrand-Lions, M. (2004). "Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes." *Nat Rev Immunol* 4(6): 432-44.
- Inohara, N., Ogura, Y. and Nunez, G. (2002). "Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens." *Curr Opin Microbiol* 5(1): 76-80.
- Itahana, K., Bhat, K. P., Jin, A., Itahana, Y., Hawke, D., Kobayashi, R. and Zhang, Y. (2003). "Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation." *Mol Cell* 12(5): 1151-64.
- Itahana, K. and Zhang, Y. (2008). "Mitochondrial p32 is a critical mediator of ARF-induced apoptosis." *Cancer Cell* 13(6): 542-53.
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y. and Suda, T. (2006). "Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells." *Nat Med* 12(4): 446-51.
- Iwami, K. I., Matsuguchi, T., Masuda, A., Kikuchi, T., Musikacharoen, T. and Yoshikai, Y. (2000). "Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling." *J Immunol* 165(12): 6682-6.
- Jacks, T., Remington, L., Williams, B. O., Schmitt, E. M., Halachmi, S., Bronson, R. T. and Weinberg, R. A. (1994). "Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice." *Curr Biol* 4(1): 1-7.
- Jacobs, J. J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R. A. and van Lohuizen, M. (1999). "The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus." *Nature* 397(6715): 164-8.
- Johnson, E. S. (2004). "Protein modification by SUMO." *Annu Rev Biochem* 73: 355-82.
- Kaji, T., Kaieda, I., Hisatsune, T. and Kaminogawa, S. (2002). "3-Morpholinopyridone hydrochloride induces p53-dependent apoptosis in murine primary neural cells: a critical role for p21(ras)-MAPK-p19(ARF) pathway." *Nitric Oxide* 6(2): 125-34.
- Kamijo, T., Bodner, S., van de Kamp, E., Randle, D. H. and Sherr, C. J. (1999). "Tumor spectrum in ARF-deficient mice." *Cancer Res* 59(9): 2217-22.
- Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M. F., Quelle, D. E., Downing, J. R., Ashmun, R. A., Grosveld, G. and Sherr, C. J. (1997). "Tumor suppression at the mouse *INK4a* locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF." *Cell* 91(5): 649-59.
- Karin, M. (2006). "NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets." *Mol Carcinog* 45(6): 355-61.
- Karin, M. (2006). "Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression." *Nature* 441(7092): 431-6.

- Karin, M. and Lin, A. (2002). "NF-kappaB at the crossroads of life and death." *Nat Immunol* 3(3): 221-7.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999). "Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin." *Immunity* 11(1): 115-22.
- Kawai, T. and Akira, S. (2006). "TLR signaling." *Cell Death Differ* 13(5): 816-25.
- Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Muhlradt, P. F., Sato, S., Hoshino, K. and Akira, S. (2001). "Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes." *J Immunol* 167(10): 5887-94.
- Kelly-Spratt, K. S., Gurley, K. E., Yasui, Y. and Kemp, C. J. (2004). "p19Arf suppresses growth, progression, and metastasis of Hras-driven carcinomas through p53-dependent and -independent pathways." *PLoS Biol* 2(8): E242.
- Komarova, E. A., Krivokrysenko, V., Wang, K., Neznanov, N., Chernov, M. V., Komarov, P. G., Brennan, M. L., Golovkina, T. V., Rokhlin, O. W., Kuprash, D. V., Nedospasov, S. A., Hazen, S. L., Feinstein, E. and Gudkov, A. V. (2005). "p53 is a suppressor of inflammatory response in mice." *Faseb J* 19(8): 1030-2.
- Korgaonkar, C., Hagen, J., Tompkins, V., Frazier, A. A., Allamargot, C., Quelle, F. W. and Quelle, D. E. (2005). "Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function." *Mol Cell Biol* 25(4): 1258-71.
- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M. R., Kovalev, G. I., Al-Regaiey, K., Su, L. and Sharpless, N. E. (2004). "Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging." *J Clin Invest* 114(9): 1299-307.
- Kubbutat, M. H., Jones, S. N. and Vousden, K. H. (1997). "Regulation of p53 stability by Mdm2." *Nature* 387(6630): 299-303.
- Kumar, H., Kawai, T. and Akira, S. (2009). "Pathogen recognition in the innate immune response." *Biochem J* 420(1): 1-16.
- Kumar, H., Kawai, T. and Akira, S. (2009). "Toll-like receptors and innate immunity." *Biochem Biophys Res Commun* 388(4): 621-5.
- Kuo, M. L., den Besten, W., Bertwistle, D., Roussel, M. F. and Sherr, C. J. (2004). "N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor." *Genes Dev* 18(15): 1862-74.
- Kuper, H., Adami, H. O. and Trichopoulos, D. (2000). "Infections as a major preventable cause of human cancer." *J Intern Med* 248(3): 171-83.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.
- Landry, J. R., Mager, D. L. and Wilhelm, B. T. (2003). "Complex controls: the role of alternative promoters in mammalian genomes." *Trends Genet* 19(11): 640-8.

- Laud, K., Marian, C., Avril, M. F., Barrois, M., Chompret, A., Goldstein, A. M., Tucker, M. A., Clark, P. A., Peters, G., Chaudru, V., Demenais, F., Spatz, A., Smith, M. W., Lenoir, G. M. and Bressac-de Paillerets, B. (2006). "Comprehensive analysis of CDKN2A (p16INK4A/p14ARF) and CDKN2B genes in 53 melanoma index cases considered to be at heightened risk of melanoma." *J Med Genet* 43(1): 39-47.
- Lawrence, T., Willoughby, D. A. and Gilroy, D. W. (2002). "Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation." *Nat Rev Immunol* 2(10): 787-95.
- Lee, C., Smith, B. A., Bandyopadhyay, K. and Gjerset, R. A. (2005). "DNA damage disrupts the p14ARF-B23(nucleophosmin) interaction and triggers a transient subnuclear redistribution of p14ARF." *Cancer Res* 65(21): 9834-42.
- Lee, M. S. and Kim, Y. J. (2007). "Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk." *Annu Rev Biochem* 76: 447-80.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." *Cell* 86(6): 973-83.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. and Nourshargh, S. (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." *Nat Rev Immunol* 7(9): 678-89.
- Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K. and O'Neill, L. A. (2005). "Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses." *Nat Rev Immunol* 5(6): 446-58.
- Liggett, W. H., Jr., Sewell, D. A., Rocco, J., Ahrendt, S. A., Koch, W. and Sidransky, D. (1996). "p16 and p16 beta are potent growth suppressors of head and neck squamous carcinoma cells in vitro." *Cancer Res* 56(18): 4119-23.
- Lin, W. W. and Karin, M. (2007). "A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer." *J Clin Invest* 117(5): 1175-83.
- Liu, G., Park, Y. J., Tsuruta, Y., Lorne, E. and Abraham, E. (2009). "p53 Attenuates lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation and acute lung injury." *J Immunol* 182(8): 5063-71.
- Liu, Y., Sanoff, H. K., Cho, H., Burd, C. E., Torrice, C., Mohlke, K. L., Ibrahim, J. G., Thomas, N. E. and Sharpless, N. E. (2009). "INK4/ARF transcript expression is associated with chromosome 9p21 variants linked to atherosclerosis." *PLoS One* 4(4): e5027.
- Lowe, S. W. and Sherr, C. J. (2003). "Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles." *Curr Opin Genet Dev* 13(1): 77-83.
- Maestro, R., Dei Tos, A. P., Hamamori, Y., Krasnokutsky, S., Sartorelli, V., Kedes, L., Doglioni, C., Beach, D. H. and Hannon, G. J. (1999). "Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis." *Genes Dev* 13(17): 2207-17.
- Majno, G. (1975). *The healing hand : man and wound in the ancient world*. Cambridge, Mass., Harvard University Press.

- Mantovani, A., Romero, P., Palucka, A. K. and Marincola, F. M. (2008). "Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment." *Lancet* 371(9614): 771-83.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. and Locati, M. (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." *Trends Immunol* 25(12): 677-86.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. and Sica, A. (2002). "Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes." *Trends Immunol* 23(11): 549-55.
- Mao, L., Merlo, A., Bedi, G., Shapiro, G. I., Edwards, C. D., Rollins, B. J. and Sidransky, D. (1995). "A novel p16INK4A transcript." *Cancer Res* 55(14): 2995-7.
- Martelli, F., Hamilton, T., Silver, D. P., Sharpless, N. E., Bardeesy, N., Rokas, M., DePinho, R. A., Livingston, D. M. and Grossman, S. R. (2001). "p19ARF targets certain E2F species for degradation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(8): 4455-60.
- Martin, K., Trouche, D., Hagemeyer, C., Sorensen, T. S., La Thangue, N. B. and Kouzarides, T. (1995). "Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein." *Nature* 375(6533): 691-4.
- Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M. and Mantovani, A. (2006). "Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression." *J Immunol* 177(10): 7303-11.
- Martinez, F. O., Helming, L. and Gordon, S. (2009). "Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective." *Annu Rev Immunol* 27: 451-83.
- Matheu, A., Maraver, A., Klatt, P., Flores, I., Garcia-Cao, I., Borrás, C., Flores, J. M., Vina, J., Blasco, M. A. and Serrano, M. (2007). "Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway." *Nature* 448(7151): 375-9.
- Matheu, A., Pantoja, C., Efeyan, A., Criado, L. M., Martin-Caballero, J., Flores, J. M., Klatt, P. and Serrano, M. (2004). "Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging." *Genes Dev* 18(22): 2736-46.
- Matsuguchi, T., Musikachoen, T., Ogawa, T. and Yoshikai, Y. (2000). "Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages." *J Immunol* 165(10): 5767-72.
- McCartney-Francis, N., Jin, W. and Wahl, S. M. (2004). "Aberrant Toll receptor expression and endotoxin hypersensitivity in mice lacking a functional TGF-beta 1 signaling pathway." *J Immunol* 172(6): 3814-21.
- McKeller, R. N., Fowler, J. L., Cunningham, J. J., Warner, N., Smeyne, R. J., Zindy, F. and Skapek, S. X. (2002). "The Arf tumor suppressor gene promotes hyaloid vascular regression during mouse eye development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6): 3848-53.
- Medzhitov, R. (2008). "Origin and physiological roles of inflammation." *Nature* 454(7203): 428-35.

- Medzhitov, R. and Horng, T. (2009). "Transcriptional control of the inflammatory response." *Nat Rev Immunol* 9(10): 692-703.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C. A., Jr. (1997). "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity." *Nature* 388(6640): 394-7.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S. and Janeway, C. A., Jr. (1998). "MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways." *Mol Cell* 2(2): 253-8.
- Meerpohl, H. G., Lohmann-Matthes, M. L. and Fischer, H. (1976). "Studies on the activation of mouse bone marrow-derived macrophages by the macrophage cytotoxicity factor (MCF)." *Eur J Immunol* 6(3): 213-7.
- Morrison, D. C. and Ryan, J. L. (1987). "Endotoxins and disease mechanisms." *Annu Rev Med* 38: 417-32.
- Mudhasani, R., Zhu, Z., Hutvagner, G., Eischen, C. M., Lyle, S., Hall, L. L., Lawrence, J. B., Imbalzano, A. N. and Jones, S. N. (2008). "Loss of miRNA biogenesis induces p19Arf-p53 signaling and senescence in primary cells." *J Cell Biol* 181(7): 1055-63.
- Munoz-Fontela, C., Garcia, M. A., Garcia-Cao, I., Collado, M., Arroyo, J., Esteban, M., Serrano, M. and Rivas, C. (2005). "Resistance to viral infection of super p53 mice." *Oncogene* 24(18): 3059-62.
- Munoz-Fontela, C., Macip, S., Martinez-Sobrido, L., Brown, L., Ashour, J., Garcia-Sastre, A., Lee, S. W. and Aaronson, S. A. (2008). "Transcriptional role of p53 in interferon-mediated antiviral immunity." *J Exp Med* 205(8): 1929-38.
- Murakawa, M., Yamaoka, K., Tanaka, Y. and Fukuda, Y. (2006). "Involvement of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice." *Biochem Pharmacol* 71(9): 1331-6.
- Nathan, C. (2002). "Points of control in inflammation." *Nature* 420(6917): 846-52.
- Naugler, W. E. and Karin, M. (2008). "NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms." *Curr Opin Genet Dev* 18(1): 19-26.
- Navarro, A., de las Heras, B. and Villar, A. M. (1997). "Andalusol, a diterpenoid with anti-inflammatory activity from *Sideritis foetens* Clemen." *Z Naturforsch C* 52(11-12): 844-9.
- Nomura, F., Akashi, S., Sakao, Y., Sato, S., Kawai, T., Matsumoto, M., Nakanishi, K., Kimoto, M., Miyake, K., Takeda, K. and Akira, S. (2000). "Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression." *J Immunol* 164(7): 3476-9.
- Opal, S. M. and Huber, C. E. (2002). "Bench-to-bedside review: Toll-like receptors and their role in septic shock." *Crit Care* 6(2): 125-36.
- Pahl, H. L. (1999). "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors." *Oncogene* 18(49): 6853-66.



- Palmero, I., McConnell, B., Parry, D., Brookes, S., Hara, E., Bates, S., Jat, P. and Peters, G. (1997). "Accumulation of p16INK4a in mouse fibroblasts as a function of replicative senescence and not of retinoblastoma gene status." *Oncogene* 15(5): 495-503.
- Palmero, I., Pantoja, C. and Serrano, M. (1998). "p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras." *Nature* 395(6698): 125-6.
- Perkins, N. D. (2007). "Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(1): 49-62.
- Pikarsky, E., Porat, R. M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E. and Ben-Neriah, Y. (2004). "NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer." *Nature* 431(7007): 461-6.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." *Science* 282(5396): 2085-8.
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N. J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H. W., Cordon-Cardo, C. and DePinho, R. A. (1998). "The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53." *Cell* 92(6): 713-23.
- Porta, C., Rimoldi, M., Raes, G., Brys, L., Ghezzi, P., Di Liberto, D., Dieli, F., Ghisletti, S., Natoli, G., De Baetselier, P., Mantovani, A. and Sica, A. (2009). "Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(35): 14978-83.
- Prives, C. (1998). "Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit." *Cell* 95(1): 5-8.
- Quelle, D. E., Cheng, M., Ashmun, R. A. and Sherr, C. J. (1997). "Cancer-associated mutations at the INK4a locus cancel cell cycle arrest by p16INK4a but not by the alternative reading frame protein p19ARF." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(2): 669-73.
- Quelle, D. E., Zindy, F., Ashmun, R. A. and Sherr, C. J. (1995). "Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest." *Cell* 83(6): 993-1000.
- Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P. and Malo, D. (1999). "Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)." *J Exp Med* 189(4): 615-25.
- Radfar, A., Unnikrishnan, I., Lee, H. W., DePinho, R. A. and Rosenberg, N. (1998). "p19(Arf) induces p53-dependent apoptosis during abelson virus-mediated pre-B cell transformation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(22): 13194-9.
- Randerson-Moor, J. A., Harland, M., Williams, S., Cuthbert-Heavens, D., Sheridan, E., Aveyard, J., Sibley, K., Whitaker, L., Knowles, M., Bishop, J. N. and Bishop, D. T. (2001). "A germline deletion of p14(ARF) but not CDKN2A in a melanoma-neural system tumour syndrome family." *Hum Mol Genet* 10(1): 55-62.

- Randle, D. H., Zindy, F., Sherr, C. J. and Roussel, M. F. (2001). "Differential effects of p19(Arf) and p16(Ink4a) loss on senescence of murine bone marrow-derived preB cells and macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17): 9654-9.
- Rao, T. S., Currie, J. L., Shaffer, A. F. and Isakson, P. C. (1993). "Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation." *Inflammation* 17(6): 723-41.
- Ravi, R., Mookerjee, B., van Hensbergen, Y., Bedi, G. C., Giordano, A., El-Deiry, W. S., Fuchs, E. J. and Bedi, A. (1998). "p53-mediated repression of nuclear factor-kappaB RelA via the transcriptional integrator p300." *Cancer Res* 58(20): 4531-6.
- Rayet, B. and Gelinis, C. (1999). "Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer." *Oncogene* 18(49): 6938-47.
- Recio, M. C., Giner, R. M., Manez, S. and Rios, J. L. (1994). "Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents." *Planta Med* 60(3): 232-4.
- Reef, S., Shifman, O., Oren, M. and Kimchi, A. (2007). "The autophagic inducer smARF interacts with and is stabilized by the mitochondrial p32 protein." *Oncogene* 26(46): 6677-83.
- Reef, S., Zalckvar, E., Shifman, O., Bialik, S., Sabanay, H., Oren, M. and Kimchi, A. (2006). "A short mitochondrial form of p19ARF induces autophagy and caspase-independent cell death." *Mol Cell* 22(4): 463-75.
- Rehli, M. (2002). "Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression." *Trends Immunol* 23(8): 375-8.
- Ren, J. L., Pan, J. S., Lu, Y. P., Sun, P. and Han, J. (2009). "Inflammatory signaling and cellular senescence." *Cell Signal* 21(3): 378-83.
- Ries, S. J., Brandts, C. H., Chung, A. S., Biederer, C. H., Hann, B. C., Lipner, E. M., McCormick, F. and Korn, W. M. (2000). "Loss of p14ARF in tumor cells facilitates replication of the adenovirus mutant dl1520 (ONYX-015)." *Nat Med* 6(10): 1128-33.
- Rizos, H., Scurr, L. L., Irvine, M., Alling, N. J. and Kefford, R. F. (2007). "p14ARF regulates E2F-1 ubiquitination and degradation via a p53-dependent mechanism." *Cell Cycle* 6(14): 1741-7.
- Rizos, H., Woodruff, S. and Kefford, R. F. (2005). "p14ARF interacts with the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 and promotes the sumoylation of its binding partners." *Cell Cycle* 4(4): 597-603.
- Robertson, K. D. and Jones, P. A. (1998). "The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53." *Mol Cell Biol* 18(11): 6457-73.
- Rocha, S., Campbell, K. J. and Perkins, N. D. (2003). "p53- and Mdm2-independent repression of NF-kappa B transactivation by the ARF tumor suppressor." *Mol Cell* 12(1): 15-25.

- Rocha, S., Garrett, M. D., Campbell, K. J., Schumm, K. and Perkins, N. D. (2005). "Regulation of NF-kappaB and p53 through activation of ATR and Chk1 by the ARF tumour suppressor." *EMBO J* 24(6): 1157-69.
- Rodway, H., Llanos, S., Rowe, J. and Peters, G. (2004). "Stability of nucleolar versus non-nucleolar forms of human p14(ARF)." *Oncogene* 23(37): 6186-92.
- Rowland, B. D., Denissov, S. G., Douma, S., Stunnenberg, H. G., Bernards, R. and Peeper, D. S. (2002). "E2F transcriptional repressor complexes are critical downstream targets of p19(ARF)/p53-induced proliferative arrest." *Cancer Cell* 2(1): 55-65.
- Ruas, M. and Peters, G. (1998). "The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives." *Biochim Biophys Acta* 1378(2): F115-77.
- Ruddell, A., Kelly-Spratt, K. S., Furuya, M., Parghi, S. S. and Kemp, C. J. (2008). "p19/Arf and p53 suppress sentinel lymph node lymphangiogenesis and carcinoma metastasis." *Oncogene* 27(22): 3145-55.
- Sandoval, R., Xue, J., Pilkinton, M., Salvi, D., Kiyokawa, H. and Colamonici, O. R. (2004). "Different requirements for the cytostatic and apoptotic effects of type I interferons. Induction of apoptosis requires ARF but not p53 in osteosarcoma cell lines." *J Biol Chem* 279(31): 32275-80.
- Saporita, A. J., Maggi, L. B., Jr., Apicelli, A. J. and Weber, J. D. (2007). "Therapeutic targets in the ARF tumor suppressor pathway." *Curr Med Chem* 14(17): 1815-27.
- Schetter, A. J., Heegaard, N. H. and Harris, C. C. "Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways." *Carcinogenesis* 31(1): 37-49.
- Schnare, M., Barton, G. M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S. and Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses." *Nat Immunol* 2(10): 947-50.
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M. and Schaffner, W. (1989). "Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells." *Nucleic Acids Res* 17(15): 6419.
- Segal, B. H., Kuhns, D. B., Ding, L., Gallin, J. I. and Holland, S. M. (2002). "Thioglycollate peritonitis in mice lacking C5, 5-lipoxygenase, or p47(phox): complement, leukotrienes, and reactive oxidants in acute inflammation." *J Leukoc Biol* 71(3): 410-6.
- Serhan, C. N., Chiang, N. and Van Dyke, T. E. (2008). "Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators." *Nat Rev Immunol* 8(5): 349-61.
- Serhan, C. N. and Savill, J. (2005). "Resolution of inflammation: the beginning programs the end." *Nat Immunol* 6(12): 1191-7.
- Serrano, M. (1997). "The tumor suppressor protein p16INK4a." *Exp Cell Res* 237(1): 7-13.
- Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D. and DePinho, R. A. (1996). "Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality." *Cell* 85(1): 27-37.

- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J. and Schreiber, R. D. (2001). "IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." *Nature* 410(6832): 1107-11.
- Sharpless, N. E. (2004). "Ink4a/Arf links senescence and aging." *Exp Gerontol* 39(11-12): 1751-9.
- Sharpless, N. E. (2005). "INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus." *Mutat Res* 576(1-2): 22-38.
- Sharpless, N. E. and DePinho, R. A. (1999). "The INK4A/ARF locus and its two gene products." *Curr Opin Genet Dev* 9(1): 22-30.
- Sharpless, N. E., Ramsey, M. R., Balasubramanian, P., Castrillon, D. H. and DePinho, R. A. (2004). "The differential impact of p16(INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis." *Oncogene* 23(2): 379-85.
- Sherr, C. J. (2001). "The INK4a/ARF network in tumour suppression." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(10): 731-7.
- Sherr, C. J. (2001). "Parsing Ink4a/Arf: "pure" p16-null mice." *Cell* 106(5): 531-4.
- Sherr, C. J. (2006). "Divorcing ARF and p53: an unsettled case." *Nat Rev Cancer* 6(9): 663-73.
- Silva, R. L., Thornton, J. D., Martin, A. C., Rehg, J. E., Bertwistle, D., Zindy, F. and Skapek, S. X. (2005). "Arf-dependent regulation of Pdgf signaling in perivascular cells in the developing mouse eye." *EMBO J* 24(15): 2803-14.
- Springer, T. A. (1994). "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm." *Cell* 76(2): 301-14.
- Stepanova, L. and Sorrentino, B. P. (2005). "A limited role for p16Ink4a and p19Arf in the loss of hematopoietic stem cells during proliferative stress." *Blood* 106(3): 827-32.
- Stone, S., Jiang, P., Dayananth, P., Tavtigian, S. V., Katcher, H., Parry, D., Peters, G. and Kamb, A. (1995). "Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus." *Cancer Res* 55(14): 2988-94.
- Stott, F. J., Bates, S., James, M. C., McConnell, B. B., Starborg, M., Brookes, S., Palmero, I., Ryan, K., Hara, E., Vousden, K. H. and Peters, G. (1998). "The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2." *EMBO J* 17(17): 5001-14.
- Sugimoto, M., Kuo, M. L., Roussel, M. F. and Sherr, C. J. (2003). "Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing." *Mol Cell* 11(2): 415-24.
- Sun, J., Wiklund, F., Zheng, S. L., Chang, B., Balter, K., Li, L., Johansson, J. E., Li, G., Adami, H. O., Liu, W., Tolin, A., Turner, A. R., Meyers, D. A., Isaacs, W. B., Xu, J. and Gronberg, H. (2005). "Sequence variants in Toll-like receptor gene cluster (TLR6-TLR1-TLR10) and prostate cancer risk." *J Natl Cancer Inst* 97(7): 525-32.

- Sung, Y. H., Park, J., Choi, B., Kim, J., Cheong, C., Choi, Y. S., Yang, E. Y., Lee, M., Han, J. S., Park, S. C., Han, T. H., Kim, T. J., Song, J., Rhee, K. and Lee, H. W. (2005). "Hematopoietic malignancies associated with increased Stat5 and Bcl-x(L) expressions in Ink4a/Arf-deficient mice." *Mech Ageing Dev* 126(6-7): 732-9.
- Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T. and Fujikura, T. (1983). "Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes." *Anal Biochem* 132(2): 345-52.
- Tago, K., Chiocca, S. and Sherr, C. J. (2005). "Sumoylation induced by the Arf tumor suppressor: a p53-independent function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(21): 7689-94.
- Takaoka, A., Hayakawa, S., Yanai, H., Stoiber, D., Negishi, H., Kikuchi, H., Sasaki, S., Imai, K., Shibue, T., Honda, K. and Taniguchi, T. (2003). "Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence." *Nature* 424(6948): 516-23.
- Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T. W. and Taniguchi, T. (2005). "Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors." *Nature* 434(7030): 243-9.
- Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. (2003). "Toll-like receptors." *Annu Rev Immunol* 21: 335-76.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." *Immunity* 11(4): 443-51.
- Taura, M., Eguma, A., Suico, M. A., Shuto, T., Koga, T., Komatsu, K., Komune, T., Sato, T., Saya, H., Li, J. D. and Kai, H. (2008). "p53 regulates Toll-like receptor 3 expression and function in human epithelial cell lines." *Mol Cell Biol* 28(21): 6557-67.
- Ting, J. P., Lovering, R. C., Alnemri, E. S., Bertin, J., Boss, J. M., Davis, B. K., Flavell, R. A., Girardin, S. E., Godzik, A., Harton, J. A., Hoffman, H. M., Hugot, J. P., Inohara, N., Mackenzie, A., Maltais, L. J., Nunez, G., Ogura, Y., Otten, L. A., Philpott, D., Reed, J. C., Reith, W., Schreiber, S., Steimle, V. and Ward, P. A. (2008). "The NLR gene family: a standard nomenclature." *Immunity* 28(3): 285-7.
- Toledo, F. and Wahl, G. M. (2006). "Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas." *Nat Rev Cancer* 6(12): 909-23.
- Tsujimoto, H., Ono, S., Efron, P. A., Scumpia, P. O., Moldawer, L. L. and Mochizuki, H. (2008). "Role of Toll-like receptors in the development of sepsis." *Shock* 29(3): 315-21.
- Vallabhapurapu, S. and Karin, M. (2009). "Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system." *Annu Rev Immunol* 27: 693-733.
- Vallejo, G. H., Romero, C. J. and de Vicente, J. C. (2005). "Incidence and risk factors for cancer after liver transplantation." *Crit Rev Oncol Hematol* 56(1): 87-99.
- Van Ginderachter, J. A., Movahedi, K., Hassanzadeh Ghassabeh, G., Meerschaut, S., Beschin, A., Raes, G. and De Baetselier, P. (2006). "Classical and alternative activation of

mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion." *Immunobiology* 211(6-8): 487-501.

Waheed, A. and Shadduck, R. K. (1979). "Purification and properties of L cell-derived colony-stimulating factor." *J Lab Clin Med* 94(1): 180-93.

Wang, J., Hu, Y., Deng, W. W. and Sun, B. (2009). "Negative regulation of Toll-like receptor signaling pathway." *Microbes Infect* 11(3): 321-7.

Weber, J. D., Jeffers, J. R., Rehg, J. E., Randle, D. H., Lozano, G., Roussel, M. F., Sherr, C. J. and Zambetti, G. P. (2000). "p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor." *Genes Dev* 14(18): 2358-65.

Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J. and Bar-Sagi, D. (1999). "Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53." *Nat Cell Biol* 1(1): 20-6.

Wei, W., Hemmer, R. M. and Sedivy, J. M. (2001). "Role of p14(ARF) in replicative and induced senescence of human fibroblasts." *Mol Cell Biol* 21(20): 6748-57.

Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. and Mathison, J. C. (1990). "CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein." *Science* 249(4975): 1431-3.

Xaus, J., Comalada, M., Valledor, A. F., Lloberas, J., Lopez-Soriano, F., Argiles, J. M., Bogdan, C. and Celada, A. (2000). "LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha." *Blood* 95(12): 3823-31.

Xie, Q. W., Kashiwabara, Y. and Nathan, C. (1994). "Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase." *J Biol Chem* 269(7): 4705-8.

Xirodimas, D. P., Chisholm, J., Desterro, J. M., Lane, D. P. and Hay, R. T. (2002). "P14ARF promotes accumulation of SUMO-1 conjugated (H)Mdm2." *FEBS Lett* 528(1-3): 207-11.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. and Akira, S. (2003). "Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway." *Science* 301(5633): 640-3.

Young, J. M., Wagner, B. M. and Spires, D. A. (1983). "Tachyphylaxis in 12-O-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid-induced ear edema." *J Invest Dermatol* 80(1): 48-52.

Yu, Y., Maggi, L. B., Jr., Brady, S. N., Apicelli, A. J., Dai, M. S., Lu, H. and Weber, J. D. (2006). "Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export." *Mol Cell Biol* 26(10): 3798-809.

Zeini, M., Lopez-Fontal, R., Traves, P. G., Benito, G. and Hortelano, S. (2007). "Differential sensitivity to apoptosis among the cells that contribute to the atherosclerotic disease." *Biochem Biophys Res Commun* 363(2): 444-50.

- Zeini, M., Traves, P. G., Lopez-Fontal, R., Pantoja, C., Matheu, A., Serrano, M., Bosca, L. and Hortelano, S. (2006). "Specific contribution of p19(ARF) to nitric oxide-dependent apoptosis." *J Immunol* 177(5): 3327-36.
- Zhang, Y., Xiong, Y. and Yarbrough, W. G. (1998). "ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways." *Cell* 92(6): 725-34.
- Zheng, S. J., Lamhamedi-Cherradi, S. E., Wang, P., Xu, L. and Chen, Y. H. (2005). "Tumor suppressor p53 inhibits autoimmune inflammation and macrophage function." *Diabetes* 54(5): 1423-8.
- Zhu, J. W., DeRyckere, D., Li, F. X., Wan, Y. Y. and DeGregori, J. (1999). "A role for E2F1 in the induction of ARF, p53, and apoptosis during thymic negative selection." *Cell Growth Differ* 10(12): 829-38.
- Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H., Kamijo, T., Cleveland, J. L., Sherr, C. J. and Roussel, M. F. (1998). "Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization." *Genes Dev* 12(15): 2424-33.
- Zindy, F., Quelle, D. E., Roussel, M. F. and Sherr, C. J. (1997). "Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging." *Oncogene* 15(2): 203-11.
- Zindy, F., Williams, R. T., Baudino, T. A., Rehg, J. E., Skapek, S. X., Cleveland, J. L., Roussel, M. F. and Sherr, C. J. (2003). "Arf tumor suppressor promoter monitors latent oncogenic signals in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(26): 15930-5.