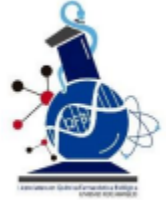




Universidad Autónoma Metropolitana



**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA SALUD
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

Informe de actividades del servicio social:

**Análisis de la participación de Dlg1 en la migración de células dendríticas
humanas**

Alumno:

Antonio Jiménez Gaytán

Matricula: 2183027903

Asesor externo:

Dra. Selma Celina Rivas Fuentes

Asesor interno:

M. C. Felipe Mendoza Pérez

Lugar de realización: Departamento de investigación en bioquímica
del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas

Periodo de realización: 01 de septiembre del 2022 al 01 de marzo del 2023

Contenido

Introducción	3
Marco teórico	4
Migración celular	4
Células dendríticas	4
Dlg1	5
Objetivo General	6
Objetivos Específico	6
Materiales y Métodos	7
Obtención de células mononucleares de sangre periférica	7
Diferenciación a células dendríticas inmaduras.....	7
Ensayo de migración de células dendríticas inmaduras hacia diferentes concentraciones de la quimiocina CXCL12	7
Cuantificación por densitometría.....	7
Cuantificación del colorante cristal violeta	8
Ensayo de migración de células dendríticas maduras con inhibición de Dlg1 y Scrib	8
Resultados	9
Discusión	14
Referencias Bibliográficas	16

Introducción

El homólogo 1 de discos grandes (Dlg1) y Scrib son proteínas de andamiaje molecular altamente conservadas en la evolución y pertenecen a la familia de las proteínas con dominios de unión PDZ, por lo que están involucradas en una gran cantidad de procesos celulares (Barreda *et al*, 2019). Además, Dlg1 pertenece a la familia de las guanilato cinasas asociadas a la membrana, varios miembros de dicha familia están involucradas en la regulación de vías de señalización vinculadas al control del crecimiento de tejidos, diferenciación, polarización celular, migración celular, entre otras funciones (Marziali *et al*, 2019). Dlg1 contiene dominios multi-PDZ (PSD95/DLG/ZO-1), un módulo de interacción de homología 3 de Src y un dominio de guanilato cinasa que es enzimáticamente inerte, por lo que esta proteína no tiene función catalítica (Barreda y Santos-Mendoza, 2018).

Se ha reportado que Dlg1 se expresa en células presentadoras de antígeno como células dendríticas, macrófagos y monocitos (Barreda *et al*, 2018). Las células dendríticas son células del sistema inmune que se encuentran principalmente en la piel y la mucosa, en donde son susceptibles de capturar y procesar antígenos. Cuando la célula dendrítica captura un antígeno inicia su maduración y adquiere una capacidad migratoria y se dirige a los ganglios. En los ganglios linfáticos, las células dendríticas maduras producen CCL19 e interactúan con las células T vírgenes recirculantes que se alojan en los ganglios linfáticos y presentan los antígenos (Matsuo *et al*, 2021). Posterior a la presentación antigénica, las células T se activan y proliferan, con ello se inicia una respuesta inmune adaptativa (Song *et al*, 2018).

Las células dendríticas maduras cambian el perfil de expresión de algunas moléculas. Se sabe que expresan moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86 que son necesarias para la activación adecuada de las células T vírgene, además de las citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, GM-CSF, MCP y TGF β (Vázquez *et al*, 2012), y receptores de quimiocinas como CXCR4 y CXCR7 que aumentan su expresión con la carga del antígeno y la maduración (Matsuo *et al*, 2021), y dirigen la migración de las células dendríticas cuando son activados por la quimiocina CXCL12 (Chen *et al*, 2018).

La fagocitosis y la migración celular son funciones celulares que requieren que la célula se polarice de forma transitoria y que se formen complejos moleculares, lo que sugiere la participación de proteínas de andamiaje con dominios PDZ. En células dendríticas se ha encontrado que la expresión de Dlg1 y Scrib aumenta cuando las células dendríticas maduran. Además, se ha reportado que Dlg1 se encuentra implicada en varias funciones de células dendríticas, como la captación de antígenos y la secreción de citocinas (Barreda *et al*, 2020).

Marco teórico

Migración celular

La migración celular es un proceso fundamental en las funciones biológicas de las células, incluyendo la respuesta inmunológica, desarrollo embrionario, regeneración de tejidos a través de células madre y cierre de heridas (Díaz, 2019); además, es importante en los procesos patológicos como la metástasis del cáncer y la inflamación (Justus *et al*, 2014).

Existen varias técnicas para evaluar la migración celular *in vitro*, entre las que se encuentran la migración celular en cámara de Boyden y el ensayo de migración Transwell®, estas técnicas se utilizan para cuantificar la capacidad migratoria de las células como respuesta a diversos quimioatrayentes como las quimiocinas (Justus *et al*, 2014). Las cámaras Transwell® están compuestas por una placa de cultivo en la que se colocan canastillas o insertos que en el fondo tienen una membrana semipermeable con microporos. Las membranas frecuentemente se recubren con algún componente de la matriz extracelular, como el colágeno o fibronectina. Las células se siembran en el compartimento superior del inserto y las células migran a través de los microporos al compartimento inferior de la placa de cultivo que contiene un estímulo quimioatrayente (Omar Zaki *et al*, 2019).

Células dendríticas

Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno profesionales y son las únicas células del sistema inmunológico que actúa como puente entre la inmunidad innata y la adaptativa, ya que participan en la inmunidad innata fagocitando a los antígenos y además tienen la capacidad de migrar a los ganglios linfáticos para presentar el antígeno a las células T y empezar el proceso de la inmunidad adaptativa. Se originan a partir de células madre hematopoyéticas por medio de la diferenciación, la cual depende de la citocina Flt3LG (Balan *et al*, 2019).

Las células de Langerhans, un tipo de células dendríticas, se encuentran principalmente en la piel y la mucosa, en donde tienen la función de capturar y procesar antígenos, para ello están equipadas con una serie de receptores de reconocimiento de patrones extracelulares e intracelulares. Cuando la célula dendrítica captura un antígeno inicia su maduración e incrementa su capacidad migratoria, lo cual aumenta la expresión del receptor CCR7. Las células dendríticas maduras que expresan el receptor de quimiocinas CCR7 se dirigen a las áreas de las células T de los ganglios linfáticos siguiendo un gradiente de la quimiocina CCL21 producidas por los vasos linfáticos. En los ganglios linfáticos, las células dendríticas maduras producen la quimiocina CCL19 que atrae a las células T vírgenes CCR7+

recirculantes alojadas en los ganglios linfáticos y se lleva a cabo la presentación de antígenos (Matsuo *et al*, 2021). Posterior a la presentación antigénica, las células T se activan y proliferan, con ello se inicia una respuesta inmune adaptativa (Song *et al*, 2018). Además, implementan una variedad de funciones diferentes, como la migración, la fagocitosis y la producción de citocinas (Barreda *et al*, 2020).

Las células dendríticas maduras presentan una morfología propia, caracterizada por la presencia de numerosas proyecciones en su membrana celular que pueden tomar la forma de dendritas (Balan *et al*, 2019). Además, las células dendríticas maduras cambian el perfil de expresión de algunas moléculas. Se sabe que expresan a las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86; que son necesarias para la activación adecuada de las células T vírgenes; además de las citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, GM-CSF, MCP y TGF β (Vázquez *et al*, 2012), y receptores de quimiocinas como CXCR4 y CXCR7 que aumentan su expresión con la carga del antígeno y la maduración (Matsuo *et al*, 2021), los cuales dirigen la migración de las células dendríticas cuando son activados por la quimiocina CXCL12 (Chen *et al*, 2018).

Dlg1

Dlg1 es una proteína de andamiaje molecular que tiene dominios de unión PDZ, las proteínas con dominios de unión PDZ se encuentran altamente conservadas en todas las especies por lo que están involucradas en una gran cantidad de procesos celulares como uniones célula-célula, polaridad celular, tráfico o señalización celular, entre otros (Barreda *et al*, 2019). Específicamente, Dlg1 está involucrada en la señalización y activación de células T, además, tiene un papel en la generación de células T de memoria, mientras que en las células B se requiere Dlg1 para estabilizar la señalización del receptor de IgG tras la estimulación, mejorando así las respuestas de memoria (Barreda *et al*, 2019).

La proteína Dlg1 se expresa en células presentadoras de antígenos y mayormente en células dendríticas. Barrada *et al*. demostraron que la expresión de Dlg1 aumenta durante la diferenciación y maduración de las células dendríticas. Por lo que dicha proteína podría tener funciones importantes relacionadas con la presentación de antígenos. En un trabajo posterior, los autores inhibieron la expresión de Dlg1 con RNA de interferencia (siRNA), y encontraron que las células en las que se inhibió Dlg1 tenían una capacidad disminuida para expresar CD83 y para producir IL-6, moléculas que son sobre-expresadas por células dendríticas maduras, la IL-6 es una citocina proinflamatoria que puede estimular la activación de las células dendríticas inmaduras para que estas maduren (Alfaro *et al*, 2013).

Adicionalmente, se ha reportado que las células dendríticas expuestas a antígenos exhiben una actividad fagocítica y endocítica disminuida, y en la producción de citocinas, cuando presentan deficiencias en la expresión de Dlg1. Por lo tanto, las células dendríticas deficientes en Dlg1 pierden sus funciones para apoyar la respuesta inmune. Además, Dlg1 parece ser importante para la captación de antígenos y la producción de citocinas en las células dendríticas de ratón (Dong *et al*, 2019). En un estudio más reciente se demostró que Dlg1 es importante para la regulación positiva de CD83 y la producción de IL-6 tras la maduración de células dendríticas. Además, se ha demostrado que Dlg1 es necesaria para la producción adecuada de IL-12 después de la maduración. No obstante, se ha descrito que la maduración ineficiente de las células dendríticas inducida por el agotamiento de Dlg1 conduce a una activación deficiente de las células T, por lo que Dlg1 juega un papel importante durante la presentación de antígenos en las células dendríticas (Barreda *et al*, 2020). Por lo anterior Dlg1 parece ser una molécula especialmente relevante en la activación de las células dendríticas, así como en las respuestas funcionales que les caracterizan.

Dlg1 es una proteína de andamiaje molecular que tiene dominios de unión PDZ que se sobre-expresa en células dendríticas, en donde se ha demostrado que participa en la secreción de la citocina IL-6 y en la expresión de la molécula co-estimuladora CD83 en estas células. Otras proteínas de unión PDZ están relacionadas con la migración celular. Sin embargo, aún no se ha establecido si en específico Dlg1 interviene en la migración celular de las células dendríticas. En resultados preliminares obtenidos por las Doctoras Selma Rivas y Teresa Santos, parecen indicar que Dlg1 participa en la migración de las células dendríticas maduras dirigidos por el eje de quimiocina receptor CXCR4-CXCL12. En ese estudio se analizó el efecto del silenciamiento de Dlg1 con RNA de interferencia (siRNA) en la migración de células dendríticas maduras hacia la quimiocina CXCL12, y se encontró que la migración fue menor en las células dendríticas maduras tratadas con el siRNA para Dlg1 (siDlg1) respecto al control de células dendríticas maduras a las cuales no se les trató con siDlg1, sugiriendo que Dlg1 regula la migración en células dendríticas maduras.

Objetivo General

Evaluar la participación de la proteína Dlg1 en la migración de células dendríticas por medio del ensayo de migración celular en cámara de Transwell.

Objetivos Específico

1. Realizar experimentos de migración celular por medio de la técnica de migración en cámara de Transwell.
2. Evaluar la migración celular por las siguientes metodologías:

- 2.1. Cuantificación por densitometría con el Sistema de documentación de imágenes Chemidoc (Bio-Rad).
- 2.2. Cuantificación por la extracción del colorante cristal violeta.
3. Validación de la activación de las células dendríticas con los marcadores HLA-DR y CD80.
4. Validación de la expresión de CXCR4 en las células migrantes.

Materiales y Métodos

Obtención de células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se obtuvieron a partir de paquetes leucocitarios de donadores aparentemente sanos, provenientes del banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. La separación de las PBMC se realizó mediante un gradiente con ficol, posteriormente se realizó una selección positiva de las células CD14+ utilizando el sistema MACS (Miltenyi Biotec Inc, Auburn, CA, EE. UU.). Los monocitos obtenidos se diferenciaron como se describe abajo.

Diferenciación a células dendríticas inmaduras

Para la diferenciación de los monocitos a células dendríticas inmaduras (iDCs), las células se trataron con las citocinas GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos) e IL-4 (Interleucina-4), la cual se les agregó después de la purificación y a las 72 y 96 horas cultivo.

Ensayo de migración de células dendríticas inmaduras hacia diferentes concentraciones de la quimiocina CXCL12

Para verificar el funcionamiento del lote de CXCL12 y para validar la correcta ejecución técnica del experimento de migración se realizaron dos curvas de migración con diferentes concentraciones de la quimiocina CXCL12. En cada inserto pre-tratado con fibronectina se colocaron 2.5×10^5 células dendríticas inmaduras (iDCs). Las iDCs migraron por 1.5 h a diferentes concentraciones de CXCL12 (10, 100 y 1000 ng/mL) y medio solo. Transcurrido el tiempo de migración los insertos fueron fijados y teñidos con cristal violeta (CV) para evidenciar las iDCs migrantes y fotodocumentados, Se realizó por duplicado cada concentración.

Cuantificación por densitometría

La cuantificación indirecta por densitometría se realizó con el sistema de documentación de imágenes, empleando el equipo Chemidoc (Bio-Rad), que cuantifica la cantidad de píxeles de cada muestra.

Cuantificación del colorante cristal violeta

Se extrajo el cristal violeta (CV) de cada inserto con SDS al 5%. El colorante obtenido por cada inserto se transfirió a 2 pozos de una placa de ELISA de 96 pozos con fondo plano. El colorante se cuantificó a una longitud de onda de 595 con el lector de ELISA Microplate Manager 6. Se sacaron los promedios para cada condición y se realizaron gráficos con los resultados obtenidos.

Ensayo de migración de células dendríticas maduras con inhibición de Dlg1 y Scrib

La inhibición de las moléculas Dlg1 y Scrib y la maduración de las iDCs se realizaron simultáneamente. Para la inhibición de las moléculas Dlg1 y Scrib de las iDCs se utilizaron los siguientes RNA pequeños de interferencia o siRNAs: siScramble, siDlg, siScrib. Para la maduración las células se trataron con las siguientes citocinas: GM-CSF, IL-4, TNF- α , IL-1 β , PGE-2. Las células se incubaron por 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂. En cada inserto se colocaron 2.5 X 10⁵ mDCs, con los tratamientos indicados en la figura 1. Cada condición se realizó por duplicado (serie B y serie C). Previamente en la parte inferior de la cámara se colocó la quimiocina CXCL12 (100 ng/mL). Las mDCs se dejaron migrar por 1.5 h. Terminando la incubación los insertos fueron fijados y teñidos con cristal violeta (CV). Los insertos fueron fotodocumentados y posteriormente el CV fue extraído con el detergente SDS, de acuerdo a lo que se indicó anteriormente.

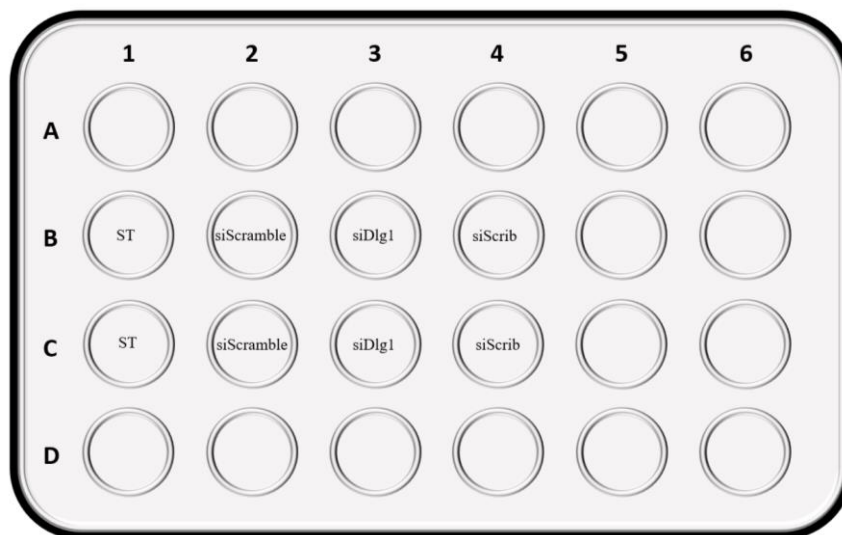


Figura 1. Esquema de migración en placa Transwell de 24 pozos. Los experimentos se hicieron por duplicado por lo que se optó por utilizar los pozos de las series B y C. En los pozos 1B y 1C se colocaron las mDCs sin tratamiento (ST), en los pozos 2B y 2C se colocaron las mDCs tratadas con el siRNA Scramble (siScramble), en los pozos 3B y 3C se colocaron las mDCs tratadas con el siRNA Dlg1 (siDlg1), y en los pozos 4B y 4C se colocaron las mDCs tratadas con el siRNA Scrib (siScrib).

Resultados

Para que las células dendríticas lleven a cabo el proceso de migración en el organismo estas deben de recibir un estímulo que las active, la migración celular es dirigida por las quimiocinas y por sus receptores. Para los experimentos de migración se utilizó como quimioatrayente la quimiocina CXCL12. Para probar el lote de CXCL12 y para verificar que el experimento es correctamente ejecutado, se realizaron 2 ensayos de dosis-respuesta de migración con células dendríticas inmaduras (iDCs) hacia diferentes concentraciones de la quimiocina. Al mirar los insertos en el microscopio se pudo observar las células teñidas que migraron a través de la membrana del inserto y conforme se iba aumentando la concentración de la quimiocina, más células migraron (figura 2). Para corroborar lo anterior se realizaron análisis cuantitativos por densitometría del inserto y cuantificación del colorante CV. Se encontró que mientras va aumentando la concentración de la quimiocina aumenta la migración celular, hasta llegar a un punto en donde la concentración es muy alta que la migración ya no aumenta y comienza a disminuir (figura 3). La concentración en la que hubo una mayor migración de iDCs fue a 100 ng/mL (figura 2 y 3).

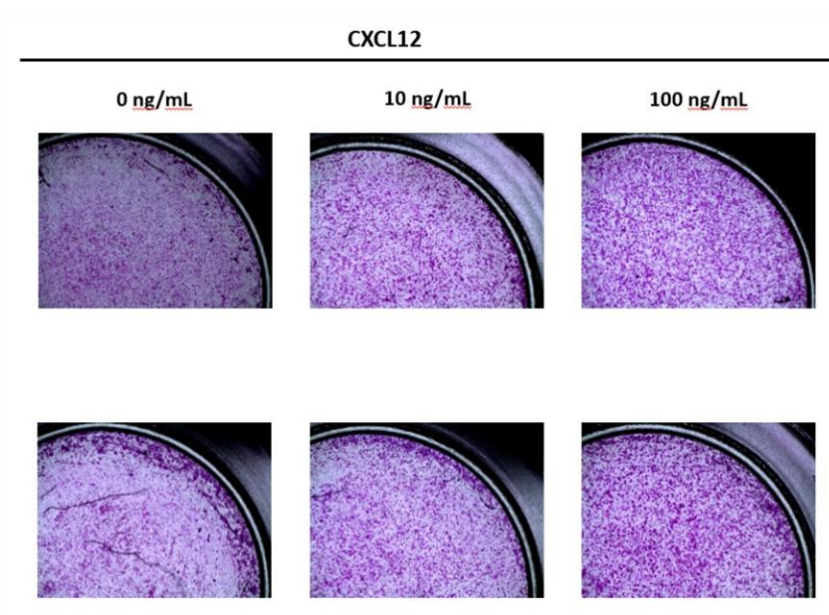


Figura 2. Micrografía a 4 aumentos de los insertos obtenidos de los ensayos de migración de la curva de migración de células iDCs hacia la quimiocina CXCL12.

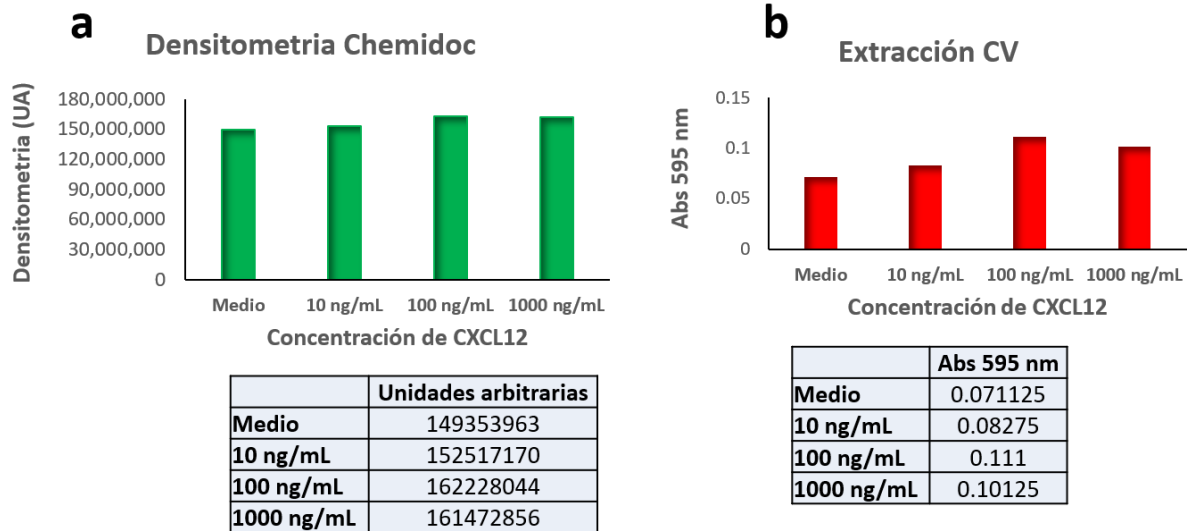


Figura 3. Cuantificación de la migración celular de células iDCs. Las células migraron hacia diferentes concentraciones de CXCL12 (10,100, 1000 ng/mL), y medio solo. Los insertos fueron procesados como se indica en materiales y métodos y posteriormente fueron cuantificadas por densitometría en el fotodocumentador Chemidoc (a) y por la extracción del colorante y su cuantificación por fotometría (b).

Las mDCs se obtuvieron a partir de la separación de monocitos de sangre periférica, los cuales se diferenciaron a iDCs tratándolas con un coctel de citocinas, para después llevar a cabo su maduración tratándolas con otro coctel de citocinas. Para validar la maduración de las células mDCs tratadas con los siRNAs y no tratadas, se realizó una análisis de citometría de flujo con células iDCs como control, para ello primero se determinó la población de las mDCs por tamaño y granularidad (figura 4a), posteriormente mediante la expresión de CD80 marcado con FITC (figura 4b), y la expresión HLA-DR (figura 4c), ya que las células mDCs aumentan la CD80, HLA-DR. Adicionalmente se evaluó la expresión de CXCR4 (figura 5b), ya que las células mDCs expresan este receptor.

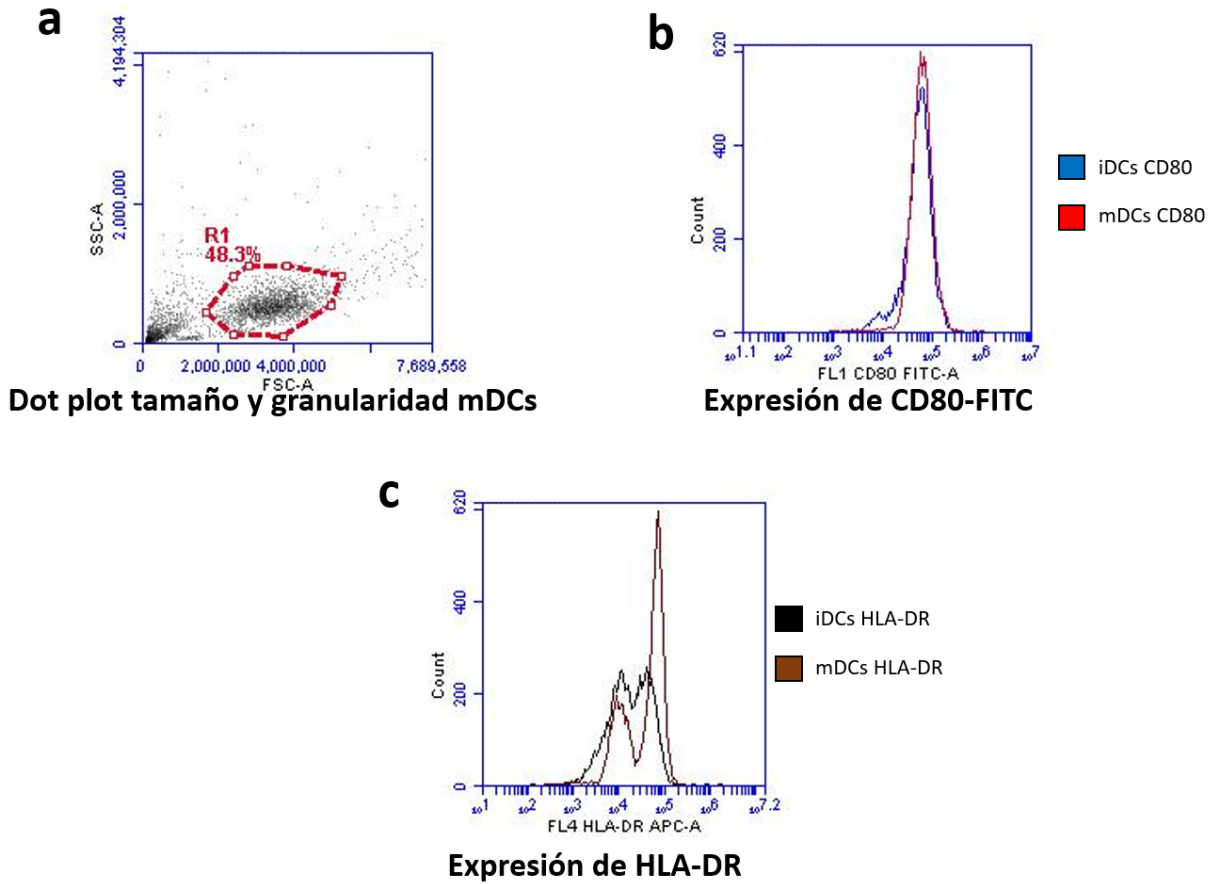


Figura 4. Validación de la efectividad del coctel de maduración de células dendríticas. La obtención de iDCs y su maduración a mDCs se validó por citometría de flujo, por tamaño y granularidad (a), por su expresión de CD80-FITC (b) y HLA-DR (c).

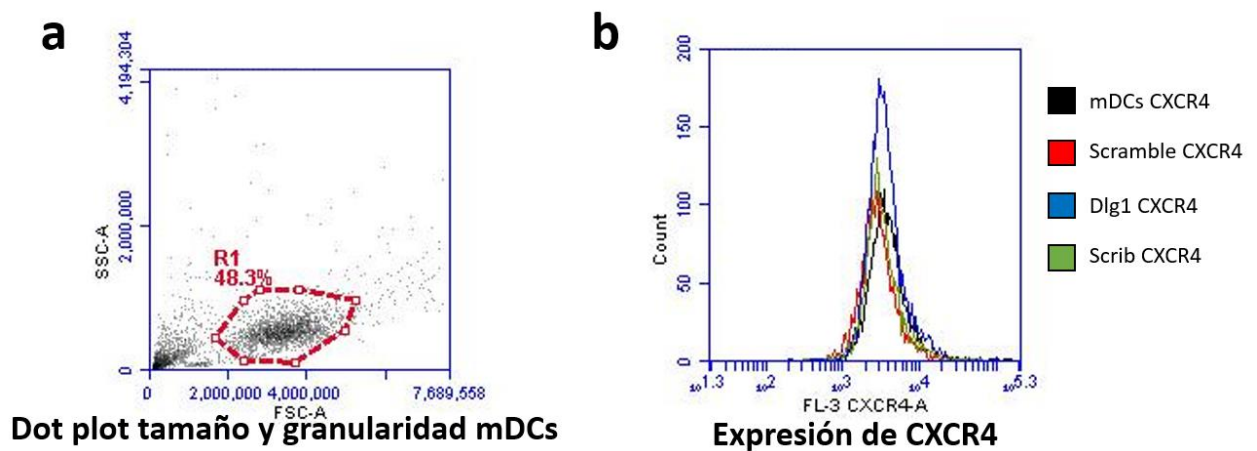


Figura 5. Las mDCs derivadas de monocitos humanos expresan CXCR4. A partir de la selección de la población de mDCs por tamaño y granularidad (a), se evaluó por citometría de flujo la expresión de CXCR4 en las mDCs tratadas con los diferentes siRNAs (siScramble, siDlg1, siScrib) (b).

Para observar si el silenciamiento de Dlg1 disminuye la migración de células mDCs se comparó contra las células mDCs tratadas con siScramble, una sonda irrelevante. Se tomaron las fotos de cada inserto a cuatro aumentos (figura 6). En los resultados obtenidos no se observó una gran diferencia en la migración de las mDCs tratadas con el siScramble y siDlg1. Para determinar si hay alguna diferencia en la migración se realizaron los análisis cuantitativos de densitometría y extracción del colorante CV, sin embargo, los resultados no muestran una clara disminución de la migración de células mDCs tratadas con siDlg1 (figura 7).

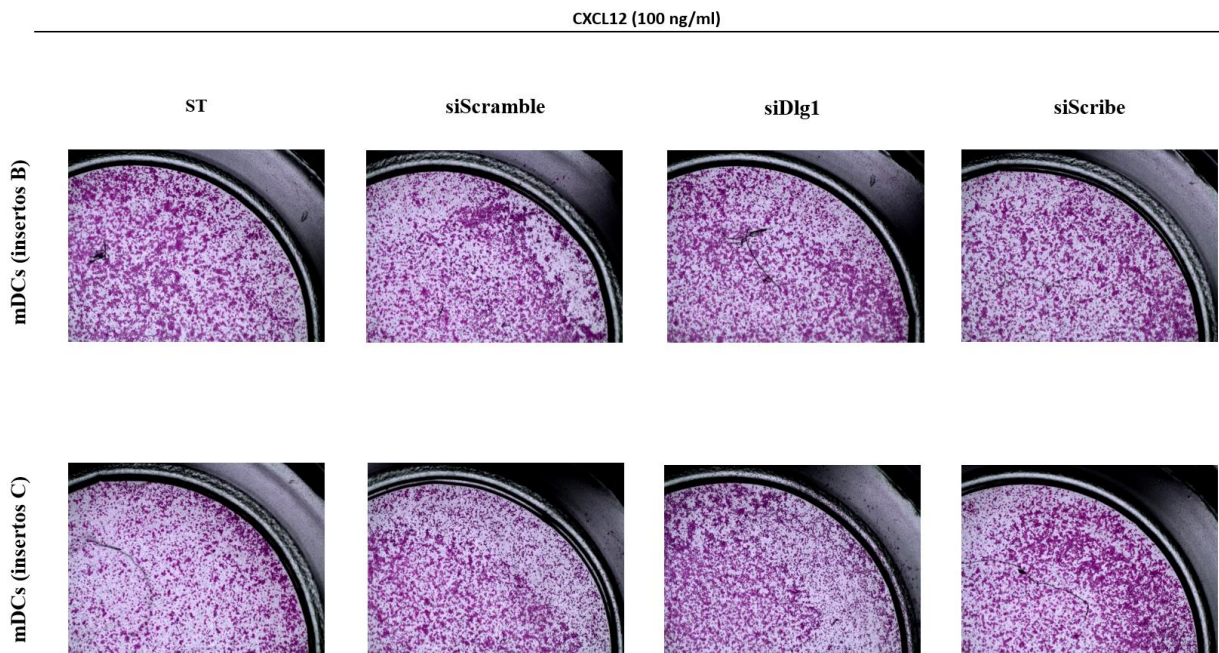


Figura 6. Micrografía a 4 aumentos de los insertos de la cámara Transwell del ensayo de migración 1 de las mDCs con los diferentes tratamientos hacia la quimiocina CXCL12.

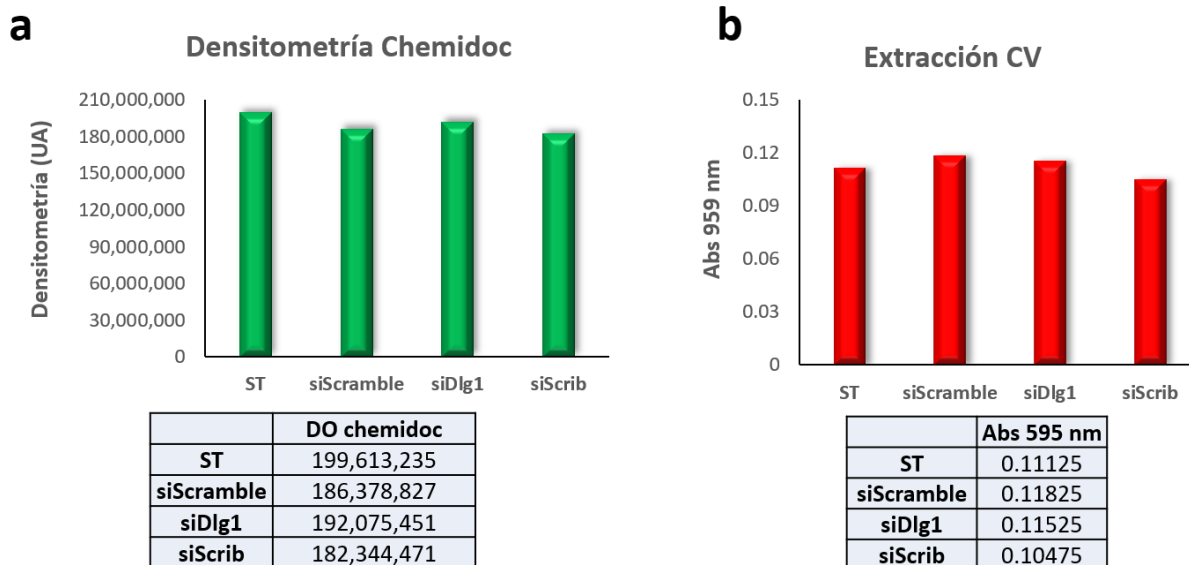


Figura 7. Cuantificación de la migración celular de células mDCs del experimento 1. Las células con los diferentes tratamientos migraron hacia la quimiocina CXCL12 (100 ng/mL). Los insertos fueron procesados como se indica en materiales y métodos y posteriormente fueron cuantificadas por densitometría en el fotodocumentador Chemidoc (a) y por la extracción del colorante y su cuantificación por fotometría (b).

Se realizó otro experimento de migración para determinar si el silenciamiento de Dlg1 disminuye la migración ya que los resultados del experimento 1 no fueron concluyentes. Se tomaron las fotos de cada inserto a cuatro aumentos (figura 8), en donde si se observa diferencia en la migración de las mDCs con los diferentes tratamientos, sin embargo, los insertos de la serie C muestran muy pocas células por lo que para los análisis cuantitativos solo se tomaron en cuenta los insertos de la serie B. En la figura 8 se observa que el silenciamiento de Dlg1 disminuye la migración de las células mDCs tanto en el análisis de densitometría (figura 9a), como en la cuantificación del colorante CV extraído (figura 9b).

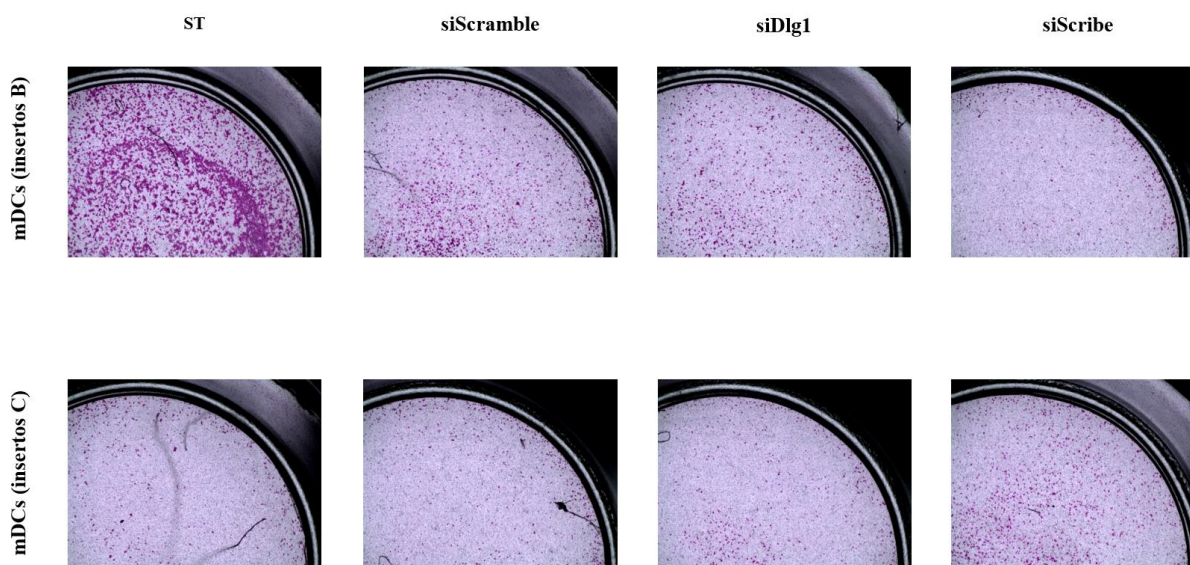


Figura 8. micrografía a 2 aumentos de los insertos de la cámara Transwell del ensayo de migración 2 de las mDCs hacia la quimiocina CXCL12.

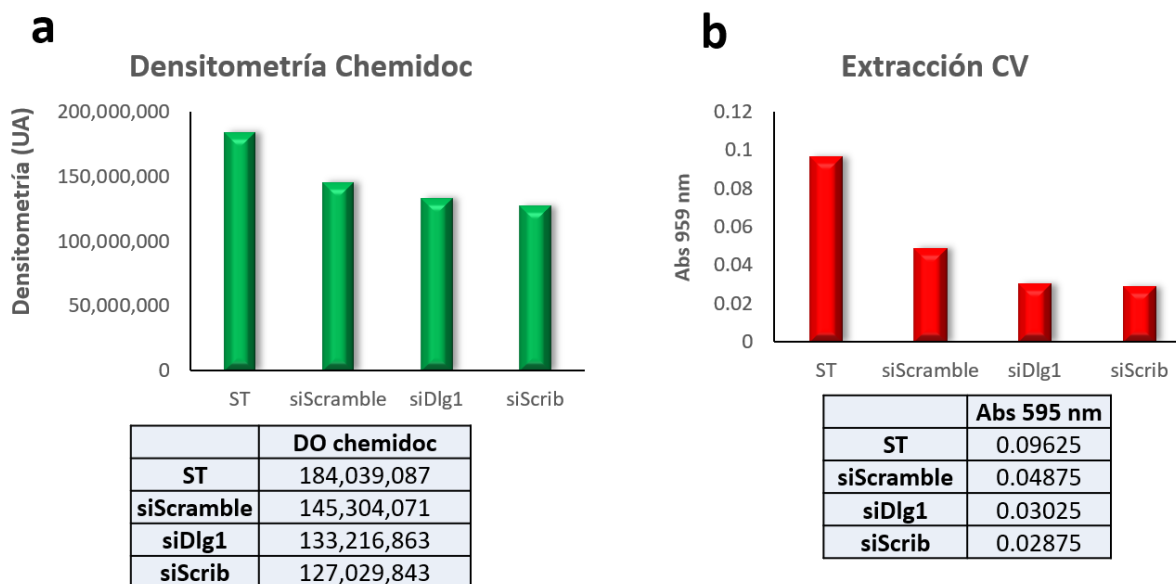


Figura 9. Cuantificación de la migración celular de células mDCs del experimento 2. Las células con los diferentes tratamientos migraron hacia la quimiocina CXCL12 (100 ng/mL). Los insertos fueron procesados como se indica en materiales y métodos y posteriormente fueron cuantificadas por densitometría en el fotodocumentador Chemidoc (a) y por la extracción del colorante y su cuantificación por fotometría (b).

Discusión

Al realizar los experimentos de migración para determinar que concentración de quimiocina CXCL12 se emplearía, hubo problemas con el primer ensayo ya que se maltrataron mucho los insertos al momento de limpiarlos con los hisopos, ya que se empleó demasiada fuerza, por lo que no fue posible la captura de imágenes de los insertos, además esto nos indica que el método es muy sensible. Para el segundo ensayo no se contó con los 8 insertos, por lo que no hubo un duplicado para concentración de 1000 ng/mL, es por ello que se optó por utilizar la concentración de 100 ng/mL para los experimentos de migración de células mDCs, ya que presentó una gran migración de las células iDCs.

Los resultados del experimento 1 de migración de células mDCs con los diferentes tratamientos (figura 7), no muestran la misma tendencia que los resultados del experimento 2 (figura 9), debido probablemente a que las células se obtuvieron de dos individuos diferentes, Además, los individuos eran aparentemente sanos por lo que no se sabe en su totalidad si lo son, esto posiblemente afecta los resultados ya que no hay un buen control. Sin embargo, los resultados de los análisis cuantitativos (figura 7 y 9), muestran una disminución de la migración de células mDCs tratadas con siDlg1 con respecto al control siScramble, solo en el análisis de densitometría del experimento 1 no muestra esta tendencia (figura 7a), esto posiblemente por las limitantes de esta técnica, ya que esta mide los píxeles de fondo, por lo que si en los insertos queda algún resto de los hisopos al momento de limpiarlos, al realizar este análisis los toma en cuenta y esto hace que se vean afectado los resultados.

De acuerdo a los resultados mostrados en las figuras 7 y 9 podrían indicar que el silenciamiento de Dlg1 disminuye la migración de mDCs. Además, experimentos que se analizaron anteriormente, para aprender los métodos de análisis, muestran una tendencia de disminución de la migración de las células mDCs tratadas con siDlg1. Sin embargo, faltarían realizar más experimentos para concluir que realmente Dlg1 participa en la migración de las células mDCs, y al disminuir su expresión las células disminuyen su migración.

En el servicio social realizado se cumplió con los objetivos académicos y experimentales planteados en el mismo.

Referencias Bibliográficas

1. Alfaro, C., Oñate, C., Rodríguez, A., Pérez-Gracia, J.L., Fernández de Sanmamed, M., & Melero, I. (2013). Células dendríticas especializadas en presentación de antígenos exógenos a linfocitos T citotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 36(3), 519-537. <https://dx.doi.org/10.4321/S1137-66272013000300016>
2. Balan, S., Saxena, M., & Bhardwaj, N. (2019). Dendritic cell subsets and locations. *International review of cell and molecular biology*, 348, 1–68. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2019.07.004>
3. Barreda, D., Sánchez-Galindo, M., López-Flores, J., Nava-Castro, K. E., Bobadilla, K., Salgado-Aguayo, A., & Santos-Mendoza, T. (2018). PDZ proteins are expressed and regulated in antigen-presenting cells and are targets of influenza A virus. *Journal of leukocyte biology*, 103(4), 731–738. <https://doi.org/10.1002/JLB.4AB0517-184R>
4. Barreda, D., Gutiérrez-González, L. H., Martínez-Cordero, E., Cabello-Gutiérrez, C., Chacón-Salinas, R., & Santos-Mendoza, T. (2020). The Scribble Complex PDZ Proteins in Immune Cell Polarities. *Journal of immunology research*. 5649790. <https://doi.org/10.1155/2020/5649790>
5. Barreda, D., Ramón-Luing, L. A., Duran-Luis, O., Bobadilla, K., Chacón-Salinas, R., & Santos-Mendoza, T. (2020). Scrib and Dlg1 polarity proteins regulate Ag presentation in human dendritic cells. *Journal of leukocyte biology*, 108(3), 883–893. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MA0320-544RR>
6. Barreda, D., & Santos-Mendoza. Scribble and DLG1 participation during dendritic cell maturation and antigen presentation. *IMMUNO MEXICO 2018*, 210. https://www.researchgate.net/profile/Elizabeth_Salinas_Estrella/publication/328389976_Antibodies_generated_against_bovine_CD205_using_a_bioinformatics_approach/links/5bca0548458515f7d9cb8310/Antibodies-generated-against-bovine-CD205-using-a-bioinformatics-approach.pdf#page=210
7. Corado, J. (2005). Células dendríticas, respuesta inmunitaria y señales de peligro. *Gaceta Médica de Caracas*, 113(4), 474-484.
8. Chen, K., Bao, Z., Tang, P., Gong, W., Yoshimura, T. y Wang, JM (2018). Quimiocinas en homeostasis y enfermedades. *Inmunología celular y molecular*, 15 (4), 324-334.
9. Díaz Aragón, R. (2019). Estudio de la fosfolipasa D en los mecanismos de migración e invasión inducidos por ácido linoleico en células de cáncer de mama MDA-MB-231.

- <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/3509/SSIT0015958.pdf?sequence=1>
10. Dong, X., Wei, L., Guo, X., Yang, Z., Wu, C., Li, P., Lu, L., Qi, H., Shi, Y., Hu, X., Wu, L., Chen, L., & Liu, W. (2019). Dlg1 Maintains Dendritic Cell Function by Securing Voltage-Gated K⁺ Channel Integrity. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 202(11), 3187–3197. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900089>
 11. JoVE Science Education Database. Biología Celular. Ensayo de migración de Transwell. JoVE, Cambridge, MA, (2022). <https://www.jove.com/es/v/5644/the-transwell-migration-assay?language=Spanish>
 12. Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., & Yang, L. V. (2014). In vitro cell migration and invasion assays. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (88), 51046. <https://doi.org/10.3791/51046>
 13. Luck, K., Charbonnier, S., & Travé, G. (2012). The emerging contribution of sequence context to the specificity of protein interactions mediated by PDZ domains. *FEBS letters*, 586(17), 2648–2661. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.03.056>
 14. Marziali, F., Dizanzo, M., Cavatorta, A. & Gardiol, D. (2019). Differential expression of DLG1 as a common trait in different human diseases: an encouraging issue in molecular pathology. *Biological Chemistry*, 400(6), 699-710. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0350>
 15. Matsuo, K., Yoshie, O., & Nakayama, T. (2021). Multifaceted Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Tumor Immunity. *Cancers*, 13(23), 6132. <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/23/6132>
 16. Omar Zaki, S. S., Kanesan, L., Leong, M. Y. D., & Vidyadaran, S. (2019). The influence of serum-supplemented culture media in a transwell migration assay. *Cell biology international*, 43(10), 1201–1204. <https://doi.org/10.1002/cbin.11122>
 17. Song, L., Dong, G., Guo, L., & Graves, D. T. (2018). The function of dendritic cells in modulating the host response. *Molecular oral microbiology*, 33(1), 13–21. <https://doi.org/10.1111/omi.12195>
 18. Teicher, B. A. & Fricker, S. P. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. *Clin Cancer Res*, 16 (11): 2927–2931. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2329>
 19. Vázquez, M. B., Sureda, M., & Rebollo, J. (2012). Células dendríticas I: aspectos básicos de su biología y funciones. *Inmunología*, 31(1), 21-30.

20. Walch L. (2013). Emerging role of the scaffolding protein Dlg1 in vesicle trafficking. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 14(9), 964–973. <https://doi.org/10.1111/tra.12089>
21. Zuluaga, M., Trujillo, C. M., Patiño, P. J., & Robledo, S. M. (2002). CD28/CD152-B7 y CD40-CD40L: dos vías coestimuladoras de importancia para la respuesta inmune adquirida. *Acta méd. colomb*, 125-133.