

00551  
23



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UN/M POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ESTUDIO DE LAS VÍAS BIOQUÍMICAS  
INVOLUCRADAS EN LA SEÑALIZACIÓN  
MEDIADA POR LOS FcγR

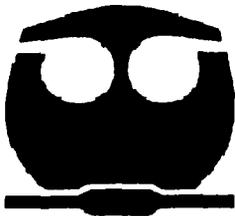
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

**PAULA GUADALUPE SANTOYO RAMOS**

Tutor: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO



MÉXICO, D. F.

Octubre 2003

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# ESTUDIO DE LAS VÍAS BIOQUÍMICAS INVOLUCRADAS EN LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR LOS FcγR

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Enrique Ortega Soto en el laboratorio de Inmunología, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:  
Dr. Alejandro Zentella Dehesa                      Instituto de Fisiología Celular, UNAM  
Dra. Ma. Elena Ibarra Rubio                      Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de QFB. Claudia Angélica Garay Canales en los experimentos de fagocitosis. Se reconoce la asesoría técnica de Ph.D. Isabel Soto Cruz en los experimentos de actividad de cinasa *in vitro*.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (31783N) y PAPIT-UNAM (IN213701).

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 4 de Diciembre de 2003.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Jesús Adolfo García Sainz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. Ivonne Rosenstein Azoulay	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Gloria Soldevila Melgarejo	Instituto de Inv. Biomédicas, UNAM
Suplente	Dra. Martha Robles Flores	Facultad de Medicina, UNAM

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de UNAM a difundir en formato electrónico el contenido de mi trabajo académico.  
NOMBRE: Santiago Ramos  
Ramiro Surovich  
FECHA: 21/11/03  
FIRMA: [Firma]

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

B

Das Sein ist ewig; denn Gesetze  
Bewahren die lebend'gen Schätze,  
Aus welchen sich das All geschmückt.  
Being is eternal; for laws there are to conserve the treasures of life on which the  
Universe draws for beauty.

GOETHE

Sane sicut lux seipsam et tenebras manifestat,  
sic veritas norma sui et falsi est.  
Truly, as light manifests itself and darkness, thus truth is the standard of itself  
and of error.

SPINOZA, Ethics, Pt II, Prop 43

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# INTRODUCCIÓN

## El sistema inmune

En la naturaleza ningún ser vivo está exento del ataque de parásitos. En la mayoría de los casos, se lucha contra los parásitos por los recursos y se intenta mantener la integridad física; pero además se deben enfrentar a organismos oportunistas que no tienen "ningún problema" en perder su fuente de recurso al matar a su hospedero. Por esto, resulta crítico para cualquier organismo poseer la manera de defenderse.

El sistema inmune provee los medios para defender al organismo del ataque de patógenos<sup>1</sup>. En los vertebrados superiores se presentan los mecanismos más complejos de defensa, estos han desarrollado la capacidad para "recordar" a un patógeno con el que ya tuvieron contacto. La capacidad de adaptarse y "recordar" le permite al organismo responder eficientemente a infecciones posteriores causadas por el mismo patógeno, reduciendo o incluso eliminando los síntomas de la enfermedad. Estos mecanismos se presentan durante la respuesta inmune adaptativa, donde se generan reacciones específicas para erradicar al patógeno. Sin embargo, es la respuesta innata la que monta las primeras defensas encaminadas a detener a cualquier patógeno potencial<sup>2</sup>.

La respuesta innata involucra defensas bioquímicas, físicas, mecánicas y celulares. Las defensas bioquímicas están presentes en las secreciones como el moco, la secreción de las glándulas sebáceas ó el ácido estomacal. Las barreras físicas y mecánicas se pueden observar en el epitelio queratinizado estratificado de la piel y en

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

la actividad de los cilios traqueales. Las respuestas celulares involucran mecanismos como la fagocitosis y la liberación de mediadores pro-inflamatorios y pirógenos. La mayoría de las respuestas celulares se asocian con el proceso inflamatorio, el cual se presenta si el agente infeccioso logra pasar las barreras bioquímicas y físicas<sup>2</sup>.

En el proceso inflamatorio trabajan juntos mediadores solubles y células para contener y eliminar al patógeno. Durante el proceso inflamatorio se incrementa el aporte sanguíneo y la permeabilidad capilar al área afectada, lo que permite el paso de moléculas pro-inflamatorias y quimioatrayentes, así como de anticuerpos y complemento a través del endotelio. Además, se extravasan neutrófilos, polimorfonucleares y monocitos a los tejidos circundantes<sup>3</sup>.

La migración de los monocitos de sangre periférica a los tejidos extravasculares involucra su adhesión al endotelio activado, la migración entre las células endoteliales y la subsecuente migración entre las estructuras subendoteliales siguiendo un gradiente de quimioatrayentes tales como componentes bacterianos (péptidos que contienen la secuencia N-f-met-leu-pro u oligonucleótidos que contienen los motivos CpG no metilados), lipopolisacárido, componentes del complemento (el fragmento 5a del complemento, C5a), quimiocinas y fragmentos de colágena<sup>3</sup>.

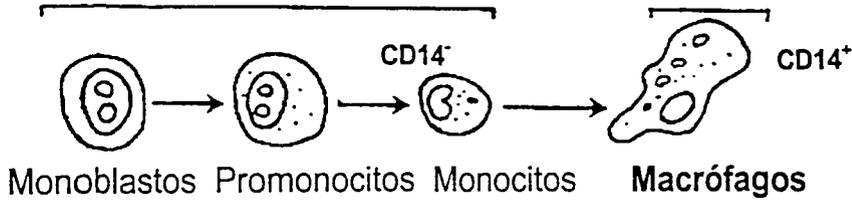
Al arribar a la zona infectada los monocitos se diferencian a macrófagos. Durante el proceso de diferenciación se incrementa la capacidad fagocítica, la cantidad de lisosomas, la actividad de peroxidasa, y la expresión de receptores para inmunoglobulina clase G (IgG)<sup>4-6</sup> (Fig.1). Además de los monocitos, macrófagos tisulares son reclutados al sitio de inflamación por el mismo gradiente de quimioatrayentes.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

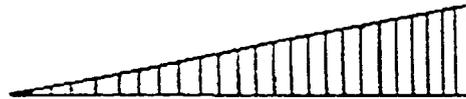
MÉDULA ÓSEA

SANGRE

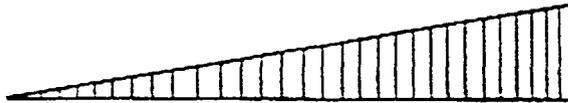
TEJIDOS



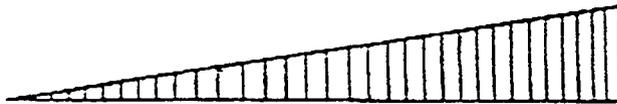
Síntesis de DNA



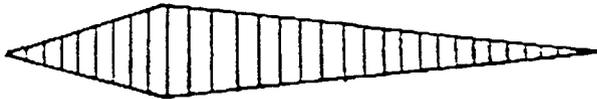
Fagocitosis



Cantidad de Lisosomas



Expresión de receptores para IgG



Actividad de Peroxidasa



Respuesta de Ca<sup>2+</sup> prolongada

Figura 1. El progreso de la diferenciación hacia el fenotipo de macrófago. En el esquema se muestra el origen y los precursores celulares en medula de los monocitos de sangre periférica y de macrófagos tisulares. Los gráficos muestran los cambios fenotípicos que presenta este linaje durante su diferenciación (modificado de Auger<sup>17</sup>). En el ratón durante el proceso de diferenciación los monocitos de sangre periférica no activados no expresan el antígeno de superficie CD14, mientras que los macrófagos si lo expresan<sup>198</sup>.

TEXTO CON  
FALTA DE ORIGEN

4

La principal actividad del macrófago es internalizar al agente infeccioso (proceso que se conoce como fagocitosis) y destruirlo, por eso es considerado un fagocito profesional. La actividad de los macrófagos es aún más relevante cuando persiste la infección, durante la inflamación crónica<sup>2</sup>.

### **Los macrófagos en el proceso inflamatorio**

Las características de la respuesta celular de los fagocitos mononucleares dependen de los receptores que exprese y de las citocinas producidas en el microambiente tisular en donde terminará el proceso de diferenciación. Los macrófagos residentes son activados en respuesta a citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-6 (IL-6), y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )<sup>7</sup>. En respuesta a este estímulo secretan múltiples citocinas. Algunas de las citocinas secretadas son quimiocinas que pueden actuar a nivel sistémico o local (Tabla 1).

A nivel sistémico, existen mecanismos de retroalimentación entre la periferia y la médula ósea (que representa el principal órgano hematopoyético durante la vida adulta), para regular la cantidad de leucocitos que se producen y liberan al torrente sanguíneo. En la vecindad de la zona inflamada, las citocinas inducen la expresión y activación de moléculas de adhesión en las células del endotelio y en leucocitos circulantes, para dirigir su extravasación y migración (Tabla 1)<sup>3</sup>.

Las moléculas de adhesión involucradas en el proceso de extravasación incluyen selectinas, integrinas y moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Las selectinas son lectinas que tienen la capacidad de unirse a carbohidratos. Las L-selectinas son expresadas en los leucocitos, mientras que la P- y E-selectinas se

Tabla 1. Quimiocinas secretadas por monocitos y macrófagos durante el proceso inflamatorio y sus efectos (tomado de Krakauer<sup>21</sup>)

QUIMIOCINA	ESTÍMULO	EFEECTO
Interleucina-8	Lipopolisacárido, mitógenos, virus, bacterias, Interleucina-1 $\beta$ , Factor de necrosis tumoral, Interleucina-3.	Movilizar neutrófilos de medula ósea, antibacterial, inflamación aguda y crónica, angiogenesis.
GRO( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )/MGSA	Lipopolisacárido, Interleucina-1 $\beta$ , Factor de necrosis tumoral.	Inflamación aguda, fibroplasia, angiogenesis.
NAP-2	Activación de plaquetas.	Inflamación aguda, reabsorción de coágulos.
ENA-78	Lipopolisacárido, Interleucina-1 $\beta$ , Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ .	Inflamación aguda, angiogenesis, movilizar neutrófilos de medula ósea.
GCP-2	-	Inflamación aguda.
IP-10	Interferón - $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , lipopolisacárido.	Inmunoestimulante, angiostático, inmunidad antitumoral.
MIG	Interferón- $\gamma$	Angiostático, resistencia a infecciones bacterianas.
I-TAC	Interferón- $\beta$	Quimioatrayente para linfocitos T
Fractalquina	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , Interleucina-1 $\beta$	Adhesión a endotelio.
MCP-1	Interleucina-1 $\beta$	Inflamación crónica, activación de macrófagos, promueve la inmunidad

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

MCP-2	-	TH <sub>2</sub> , induce la liberación de histamina en basófilos.
MCP-3	-	Inflamación crónica, activación de macrófagos, promueve la inmunidad TH <sub>2</sub> , induce la liberación de histamina en basófilos, disminuye la internalización de HIV-1 a través de CCR5.
MCP-4	-	Inflamación crónica, activación de macrófagos, promueve la inmunidad TH <sub>2</sub> , induce la liberación de histamina en basófilos, quimioatrayente para eosinófilos.
MIP-1	Lipopolisacrido, Interferón- $\gamma$	Activación de monocitos, basófilos y eosinófilos.
Eotaxina	-	Defensa antiviral, promueve la inmunidad TH <sub>1</sub>
PARC	-	Presente en tejidos traqueobronquiales durante alergias pulmonares
		Inflamación aguda

expresan en células endoteliales. Las integrinas son receptores de superficie heterodiméricos compuestos por cadenas polipeptídicas que provienen de dos familias génicas, denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ . Estos receptores son expresados por leucocitos y células endoteliales. Por lo menos seis distintas integrinas median la interacción entre leucocitos y endotelio. Los quimioatrayentes inducen la activación de las integrinas que en este proceso pasan de un estado de baja afinidad por su ligando a uno de alta, favoreciendo interacciones celulares que en condiciones normales no se dan. Las moléculas de adhesión celular, los ICAM, son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y están involucradas en procesos de adhesión célula-célula. Esta clasificación incluye a ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1 y PECAM-1. Algunas de ellas se expresan constitutivamente, como ICAM-2, VCAM-1 y PECAM-1 en células endoteliales e ICAM-3 y PECAM-1 en leucocitos. La expresión de otras integrinas es regulada en respuesta al proceso inflamatorio, como ocurre con ICAM-1 presente tanto en leucocitos como en endotelio. ICAM-1 puede interactuar con las integrinas LFA-1 y Mac-1; ICAM-2 e ICAM-3 con LFA-1; VCAM-1 con VLA-4 y PECAM-1 está involucrada en interacciones homofílicas (Fig. 2)<sup>3</sup>.

Al inicio del proceso inflamatorio, el contacto entre los monocitos y las células endoteliales se facilita por la constricción de los vasos sanguíneos que irrigan los sitios de inflamación. El primer contacto se da por interacciones mediadas por selectinas, esto le permite al monocito asociarse al endotelio y rodar sobre su superficie (Fig. 2). Al pasar por las regiones donde ocurrió daño tisular y se presenta la inflamación, el monocito interactúa con mediadores inflamatorios presentes en el glicocálix de la superficie endotelial. El tipo de moléculas que encuentre el leucocito en la superficie del

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

endotelio indicará qué tipo de células serán reclutadas. Por ejemplo, los monocitos tienen receptores para MIP-1 $\alpha$  y MCP-1 que las células polimorfonucleares no expresan. A través de estas interacciones se inicia la activación del leucocito.

Una vez que el leucocito está adherido firmemente al endotelio, ocurre la migración transendotelial (Fig.2). Los principales mediadores de este evento son integrinas (principalmente aquellas que contienen a CD18 o integrinas  $\beta$ 2) y miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas como CD31. Las células endoteliales producen interleucina-8 (IL-8), que se cree juega un papel importante en este evento. En la migración a través de la matriz extracelular están involucradas integrinas  $\beta$ 1,  $\beta$ 3 y  $\beta$ 5<sup>3</sup>.

Los quimioatrayentes dirigen la migración de los monocitos que se dirigen al sitio donde se encuentra la mayor concentración de quimioatrayente, al seguir este gradiente se dirigen al origen de la inflamación. En ese sitio las funciones efectoras del macrófago, que habían permanecido latentes, son activadas. Las principales funciones efectoras de los macrófagos activados son la generación de metabolitos tóxicos de oxígeno y nitrógeno, la liberación de proteasas y otras enzimas proteolíticas, la síntesis de citocinas y quimioatrayentes que amplifiquen la defensa del hospedero y la fagocitosis.

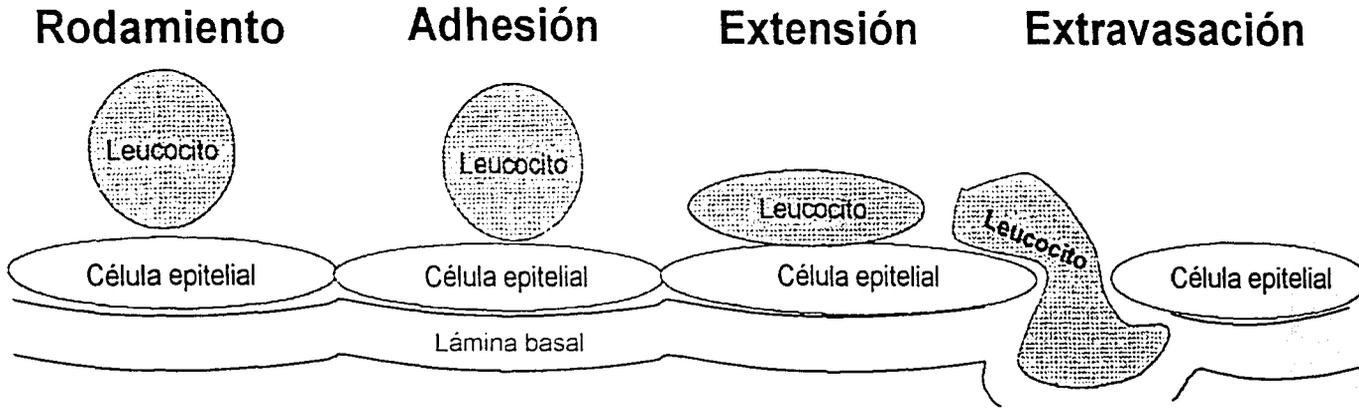
## **Funciones de los macrófagos**

### **Mecanismos microbicidas**

Los macrófagos generan metabolitos de oxígeno y nitrógeno para eliminar bacterias que pueden infectar el citoplasma celular<sup>7</sup>. Con la estimulación, el macrófago

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Flujo sanguíneo →



Leucocito/ Endotelio		Leucocito/ Endotelio		Leucocito/ Endotelio		Leucocito/ Endotelio	
Ligandos de E-selectinas	E-selectinas	Quimioatrayentes y Receptores para quimiocinas	Quimiocinas	$\alpha L\beta 2$	ICAM-1, -2	$\alpha L\beta 2$	ICAM-1, -2
Ligandos de P-selectinas	P-selectinas	L-selectinas	Ligandos de L-selectinas	$\alpha M\beta 2$	ICAM-1	$\alpha M\beta 2$	ICAM-1
L-selectinas	Ligandos de L-selectinas	[GlyCAM-1, CD34, MadCAM-]	L-selectinas	$\alpha 4\beta 1$	VCAM-1	$\alpha 4\beta 1$	VCAM-1
[GlyCAM-1, CD34, MadCAM-]	VCAM-1	PECAM-1	PECAM-1	$\alpha 4\beta 7$	MadCAM-1	$\alpha V\beta 3$	MadCAM-1
		PECAM-1	$\alpha V\beta 3$			PECAM-1	$\alpha V\beta 3$
						PECAM-1	PECAM-1

**Figura 2. Proceso de adhesión y migración de los linfocitos de sangre periférica hacia los sitios de inflamación.** Se muestra esquemáticamente los procesos de migración a través del endotelio de leucocitos de sangre periférica. Cada paso involucra la interacción de distintas moléculas de adhesión que se muestran en la parte inferior de cada figura (modificado de Paul<sup>12</sup>)

produce agentes oxidantes como el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico. Dado que este proceso involucra un aumento en la tasa respiratoria acoplada al uso de oxígeno por la célula, esta serie de cambios en el metabolismo celular se conocen como "estallido respiratorio". Este fenómeno está encaminado a generar intermediarios reactivos de oxígeno, pues la mayoría de las bacterias son susceptibles a su actividad. El estallido respiratorio puede iniciarse cuando la célula es estimulada a través de los receptores para inmunoglobulinas, para complemento y para glicoproteínas con residuos terminales de manosa. La generación de estos intermediarios reactivos de oxígeno involucra la activación de la NADPH oxidasa. Esta enzima usa oxígeno molecular y genera peróxido de hidrógeno que puede reaccionar con muchas moléculas orgánicas y generar a su vez radicales que son metabolizados para formar agentes oxidantes que actúan sobre el DNA bacteriano, sus lípidos de membrana y sus proteínas estructurales<sup>8</sup>.

El óxido nítrico se genera a partir de la L-arginina a través de una reacción catalizada por la forma inducible de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS). Los productos de esta reacción son L-citrulina y óxido nítrico (NO), que por sí mismo actúa como agente oxidante, o bien, al interactuar con radicales de oxígeno puede formar una molécula muy inestable, el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Tanto el NO como el ONOO<sup>-</sup> son agentes microbicidas que actúan inactivando enzimas que contienen núcleos hierro-azufre, S-nitrosilando proteínas, induciendo daño al DNA y sinergizando con los intermediarios reactivos de oxígeno<sup>8</sup>.

En macrófagos murinos es más importante la actividad microbicida de los intermediarios reactivos de nitrógeno. Se ha observado que ratones iNOS<sup>-/-</sup> muestran una listeriosis exacerbada y mayor susceptibilidad a la tuberculosis<sup>8</sup>.

Existen mecanismos microbicidas que no involucran la generación de radicales. El macrófago sintetiza distintas proteínas que actúan sobre distintos patógenos. Estas proteínas se acumulan en gránulos secretorios que son liberados con la estimulación celular. Algunas de las enzimas que produce el macrófago son la elastasa, colagenasas, lipasas, deoxiribonucleasas, polisacaridasas, sulfatasas, fosfatasas y defensinas. Todas ellas poseen distintas actividades microbicidas sobre bacterias, hongos y virus<sup>7</sup>.

### **Inmunomodulación: Secreción de citocinas.**

Los macrófagos secretan múltiples citocinas<sup>7,9</sup> (Tabla 2). Estas proteínas están divididas en varias familias. Las citocinas tipo I agrupan a muchas de las interleucinas (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13 y IL-15) así como a distintos factores de crecimiento hematopoyético. Las citocinas tipo II incluyen a los interferones (INF) y a la IL-10. Otro grupo es el de las moléculas relacionadas con el factor de necrosis tumoral (TNF), que incluyen al TNF y a las linfoquinas. También existen los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que incluye a la IL-1 $\beta$ . Y finalmente está el grupo de las quimiocinas<sup>10</sup>.

Las citocinas participan en la regulación de la respuesta inmune. Ellas pueden inducir la diferenciación celular; por ejemplo, la IL-6 participa en la diferenciación de los linfocitos T. Ellas también pueden estimular distintas respuestas celulares; por ejemplo, la IL-2 participa en la activación del linfocito T. Las citocinas también pueden regular la actividad de distintos tipos celulares; por ejemplo, la IL-4, IL-5 y el INF- $\gamma$  participan en el cambio de clase de inmunoglobulina que se presenta en linfocitos B. Además, la

Tabla 2. Principales citocinas secretadas por macrófagos durante el proceso inflamatorio y sus efectos (tomado de Krakauer<sup>12</sup>)

CITOCINA	ESTÍMULO	EFFECTO
Interferón - $\alpha$	Virus y bacterias	Antiviral, antimitótico, induce la expresión de moléculas MHC clase II, induce la actividad de células NK y linfocitos T, disminuye la expresión de c-myc
Factor estimulador de colonias de macrófagos	Lipopolisacárido, interleucina-1	Induce la formación de colonias de macrófagos, antiviral, induce la producción de prostaglandina E <sub>2</sub> , activador de plasminógeno, secreción de interleucina-1, Interferón- $\gamma$ , y del factor de necrosis tumoral- $\alpha$
Factor estimulador de colonias de granulocito-macrófago	Lipopolisacárido, interleucina-1, factor de necrosis tumoral, infecciones retrovirales.	Induce la formación de colonias de macrófagos, granulocitos y eosinófilos, protege contra infecciones bacterianas y contra parásitos, activa a neutrófilos y eosinófilos, induce la secreción de prostaglandina E <sub>2</sub> , interleucina-1, factor de necrosis tumoral.
Factor estimulador de colonias de granulocitos	Lipopolisacárido, interleucina-1	Induce la formación de colonias de granulocitos y la diferenciación terminal de células mieloides, activa a neutrófilos.
Factor de necrosis tumoral- $\alpha$	Lipopolisacárido, interleucina-2, interleucina-1	Necrosis tumoral, síndrome de shock endotoxico, caquexia, fiebre, interleucina-

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Interleucina-1

Productos microbianos, factor de necrosis tumoral, factor estimulador de colonias granulocito-macrófago, interleucina-2, presentación antigénica

1, antiparasítico, induce la expresión de ICAM-1, la secreción de interleucina-1, el factor estimulador de colonias de granulocito, interleucina-6, induce la expresión de MHC clase I y II.

Interleucina-6

Interleucina-1, factor de necrosis tumoral, factor de crecimiento derivado de plaquetas

Hematopoyesis, induce la expresión en linfocitos T del receptor para interleucina-2 y su diferenciación, induce la producción de Inmunoglobulinas por linfocitos B, fiebre, reclutamiento de leucocitos.

Factor de crecimiento derivado de plaquetas

Coagulación, lipopolisacarido, lectinas, zymosan

Inducción de interleucina-1, de su receptor y de Interferón  $-\gamma$  y  $-\beta$ , prostaglandina  $E_2$ , *c-myc*, *c-fos*, transporte de aminoácidos, activación de neutrófilo, reorganización intracelular del citoesqueleto, incrementa la síntesis de colágena, quimiotaxis y proliferación de células mesenquimales.

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

actividad de las citocinas puede afectar directamente a un patógeno; por ejemplo, el INF- $\alpha$  interfiere con la replicación viral<sup>10</sup>.

Muchas de las citocinas son secretadas en respuesta a la estimulación y pueden regular las respuestas del macrófago. La fagocitosis es estimulada en los sitios de inflamación a través de la integrina  $\alpha M\beta 2$ . Con la estimulación celular esta integrina es activada y media la adherencia celular. En ausencia de  $\alpha M\beta 2$ , los fagocitos circulantes no pueden activar su potencial fagocítico. Varias citocinas modulan el estado de activación de esta integrina y con ello los procesos de adhesión celular. Entre estos se encuentra el factor estimulador de colonias de macrófago-granulocito (GM-CSF) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )<sup>11</sup>.

En general, la manera en que las citocinas regulan la respuesta inmune es modulando la expresión y la síntesis de proteínas de secreción y estructurales en aquellas células que presentan receptores para alguna citocina en particular. Por ejemplo, los factores de crecimiento inducen la expresión de genes que codifican para proteínas cinasas (como c-fgr y hck), para factores de transcripción (como c-fos, c-jun, c-myc, AP-1 y Ets), para proteínas que participan en el metabolismo celular (como la ornitina descarboxilasa) y para proteínas de matriz extracelular y citoesqueleto (como fibronectina y  $\beta$ -actina). Con ello modulan la respuesta que la célula puede dar a estímulos posteriores y la preparan para procesos de proliferación y de activación celular<sup>11-12</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Fagocitosis

Los macrófagos tienen la capacidad para internalizar patógenos a través de un proceso llamado fagocitosis. La fagocitosis implica la internalización de partículas relativamente grandes ( $>0.5 \mu\text{m}$ ) por mecanismos que involucran el rearrreglo del citoesqueleto. La internalización inicia con el reconocimiento de moléculas presentes en la superficie del microorganismo, a través de receptores de membrana en el macrófago. La interacción progresiva entre estos receptores y sus ligandos permite que la membrana del fagocito envuelva al patógeno hasta cerrarse; es decir, la fagocitosis procede a manera de cierre. Los principales receptores capaces de mediar fagocitosis son algunos de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), los receptores para complemento (CR)<sup>13</sup> y los receptores para inmunoglobulinas (FcR)<sup>14,15</sup>.

Los PRR reconocen estructuras moleculares invariantes llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Algunos PRR bien caracterizados capaces de mediar fagocitosis son los receptores para lectinas tipo C, receptores "scavenger", y los receptores para complemento tipo 1 y 2, CR1/CD35 y CR2/CD21<sup>15</sup>. Algunos ejemplos de PAMP que activan la fagocitosis son el lipopolisacárido, lipoproteína bacterial, peptidoglicanos, manosas en levaduras<sup>15</sup>.

Los receptores para el complemento tipo 3, CR3 (CD11b/CD18), reconocen algunas proteínas del sistema de complemento entre otras. El CR3 es un heterodímero que contiene una cadena  $\alpha$  (CD11b) de 165 kDa y una cadena  $\beta$  (CD18) de 95 kDa. La cadena  $\alpha$  posee el sitio de unión para la fracción de complemento iC3b (y con menor afinidad para C3b y C3dg). La función más importante de CR3 es mediar la unión y fagocitosis de partículas o microorganismos recubiertos (opsonizados) con iC3b. CR3

también puede unir carbohidratos y de esa manera puede interaccionar con otros constituyentes de la membrana del patógeno. Levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y bacterias como *Staphylococcus epidermidis* pueden interaccionar con este receptor sin que el complemento este involucrado. A través de esta interacción se induce el estallido respiratorio en neutrófilos y macrófagos<sup>8</sup>.

Los receptores para las inmunoglobulinas, FcR, reconocen la porción Fc de las inmunoglobulinas. Estos receptores constituyen una familia de moléculas de superficie presentes en la mayoría de las células del sistema inmune. Los receptores que pueden mediar fagocitosis son aquellos que reconocen a la inmunoglobulina clase A (el Fc $\alpha$ R) y a la inmunoglobulina G (los Fc $\gamma$ R). En los siguientes párrafos revisaremos las características de las inmunoglobulinas, de sus receptores y la transducción de señales mediada por estos receptores en el proceso de fagocitosis<sup>8</sup>.

## Las inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas son moléculas importantes del sistema inmunológico, pueden inactivar toxinas y virus y relacionar la inmunidad humoral de la respuesta inmune adaptativa con las células efectoras de la respuesta innata<sup>17</sup>. Las inmunoglobulinas están compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas unidas a través de múltiples interacciones no covalentes y estabilizadas por puentes disulfuro (Fig. 3A). El tetrámero tiene dos cadenas pesadas idénticas entre sí y dos cadenas ligeras igualmente idénticas. Cada cadena polipeptídica individual tiene de dos a cinco dominios de inmunoglobulina. Los residuos de aminoácidos situados entre cada dominio están más expuestos y son susceptibles a proteólisis; su digestión genera

distintos fragmentos que conservan actividad biológica después de una piroólisis controlada<sup>18</sup>.

La unidad estructural fundamental de las Ig son los dominios de inmunoglobulina. Cada dominio de inmunoglobulina tiene aproximadamente 110 residuos de aminoácidos. Estos dominios forman una estructura compacta, muy resistente a la actividad de proteasas. Los módulos funcionales en una inmunoglobulina son dímeros de estos dominios. La característica más importante en un dominio de inmunoglobulina es su estructura supersecundaria. Cada dominio está formado por dos láminas  $\beta$  antiparalelas, que comprenden siete hojas  $\beta$ . Una lámina  $\beta$  contiene cuatro hojas  $\beta$  y la otra tres. Entre cada hoja  $\beta$  se encuentran asas de distinta longitud. Las dos láminas  $\beta$  están unidas a través de puentes disulfuro<sup>19</sup>.

Cada cadena ligera contiene dos dominios de inmunoglobulina, mientras que cada cadena pesada puede contener cuatro ó cinco dominios, dependiendo de la clase de inmunoglobulina. Aunque comparten la estructura común de los dominios de Ig, cada dominio de inmunoglobulina es diferente y posee características particulares y por lo tanto también nombre. El dominio N-terminal de las cadenas pesadas y ligeras es denominado variable (V), pues la secuencia de esta región difiere entre las distintas inmunoglobulinas. Los dominios variables son designados  $V_H$  y  $V_L$  para la cadena pesada (Heavy) y la cadena ligera (Light) respectivamente. Las regiones V son las responsables de la especificidad antigénica de la inmunoglobulina, las asas hipervariables de los dominios V amino-terminales de ambas cadenas forman los sitios de unión al antígeno<sup>19</sup>. Por otra parte, las secuencias de los dominios carboxilo terminal (C-terminal) no son tan variables dentro de la misma clase, por ello reciben el nombre

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

de regiones constantes (C). Los dominios C de la cadena pesada son numeradas como  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ , y así sucesivamente, empezando desde el dominio contiguo a la región V (Fig. 3B). Los dominios de la región constante de la cadena pesada son los responsables de muchas funciones de las inmunoglobulinas, como la interacción con el receptor, fijación de complemento, transferencia transplacentaria, la habilidad para multimerizarse y la capacidad para ser secretados en las mucosas<sup>19</sup>.

Al digerir a las inmunoglobulinas con papaína se pueden generar dos clases de fragmentos. Un fragmento conserva la capacidad de unión al antígeno, este es el fragmento Fab (de sus siglas en inglés antigen-binding fragment) y el otro fragmento conserva la capacidad de unión al receptor, este es el fragmento Fc (de sus siglas en inglés crystallizable fragment)(Fig. 3A). La región de la bisagra une a los Fab con el Fc, en esta zona las dos cadenas pesadas están unidas entre sí a través de un número variable de puentes disulfuro<sup>20</sup>.

La región de la bisagra determina muchas de las propiedades estructurales y funcionales de las inmunoglobulinas. Estructuralmente, la bisagra está formada por una elevada proporción de residuos de prolinas, serinas y treoninas, lo que le confiere flexibilidad a esa zona y permite que los brazos Fab se flexionen y tuerzan<sup>20</sup> (Fig. 3B). El grado de movimiento se correlaciona con el largo de la bisagra entre el primer dominio de inmunoglobulina presente en la porción Fc y el primer puente disulfuro intercadena de la zona superior de la bisagra<sup>18</sup>.

Existen cinco clases de regiones C para la cadena pesada: clase  $\alpha$ , clase  $\gamma$ , clase  $\delta$ , clase  $\epsilon$  y clase  $\mu$ . Las funciones efectoras que puede realizar una inmunoglobulina dependerán de la clase de cadena pesada que forme parte de su estructura, por lo que

cada inmunoglobulina es nombrada de acuerdo a la cadena pesada que presenta: IgA, IgG, IgD, IgE e IgM. Estos nombres corresponden con las letras griegas asignadas a cada clase de cadena pesada.

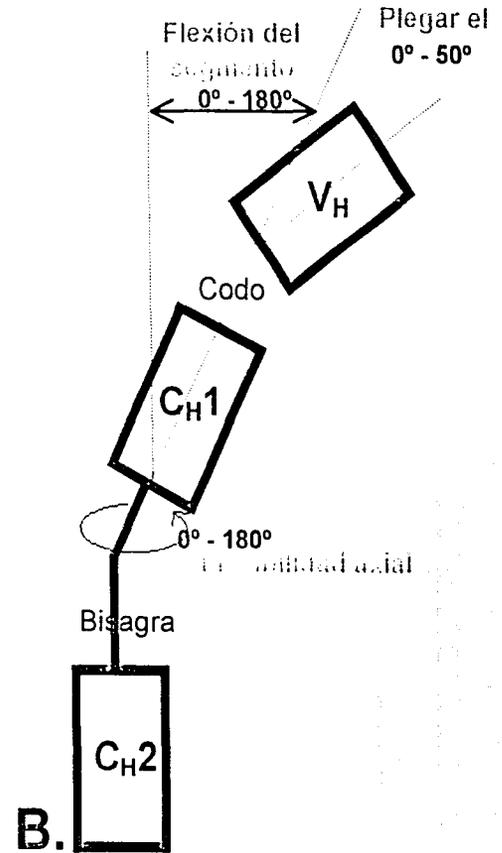
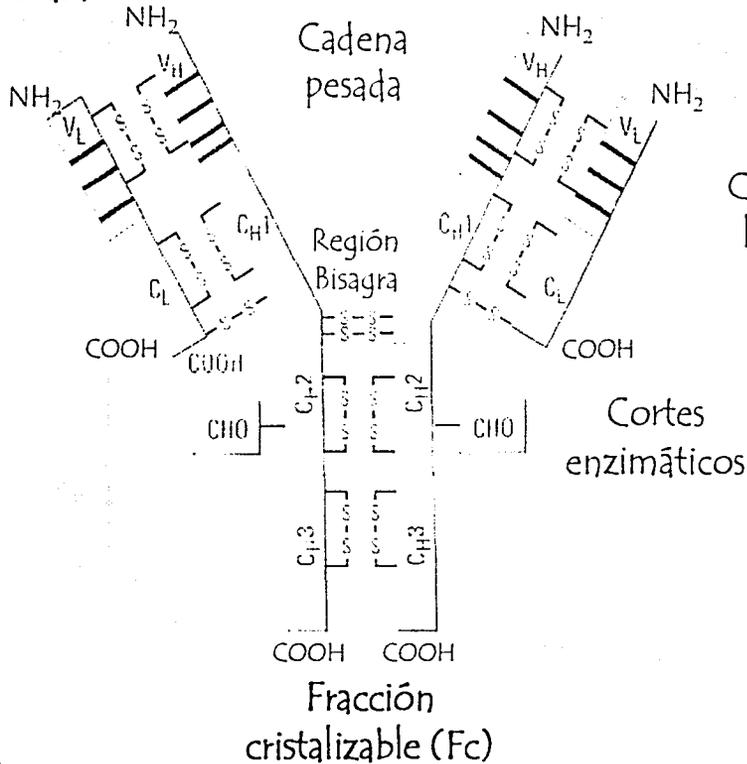
## **Inmunoglobulinas G (IgG)**

### **Subclases de IgG y sus características moleculares.**

La clase de inmunoglobulina más abundante es la clase G (IgG), representa el 75% del total de inmunoglobulinas en suero. La IgG presenta dos cadenas pesadas de peso molecular aparente de 50 kDa y dos cadenas ligeras de 25 kDa<sup>18</sup>. En el humano se han distinguido cuatro subclases: IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4; mientras que en el ratón se identificaron a las subclases: IgG1, IgG2a, IgG2b. e IgG3 (Fig. 3C), siendo la IgG1 y la IgG2a las más abundantes. Estas subclases difieren entre sí en la estructura de la región constante de la cadena pesada, incluyendo diferencias en longitud y número de puentes disulfuro en la región de la bisagra; de esta manera, las cadenas pesadas de la IgG3 murina están unidas por dos puentes disulfuro intercadena y las otras subclases murinas por tres puentes.

Gracias al desarrollo de la técnica para producir anticuerpos monoclonales pertenecientes a cada subclase se pudo determinar su secuencia y estructura. Al obtener grandes cantidades de la proteína con un alto grado de pureza se pudieron realizar análisis estructurales de resonancia magnética nuclear<sup>21</sup> y con ello se definió a la bisagra como la parte más flexible de la inmunoglobulina. Mediante análisis posteriores por polarización de fluorescencia, se determinó que la subclase IgG1 es la más rígida de todas las subclases murinas<sup>22-23</sup>. En estudios de difracción de rayos X en cristales del anticuerpo 61.1.3 (IgG1 murina), se determinó que exhibe cierto grado de

Fracción que se une al antígeno (Fab)

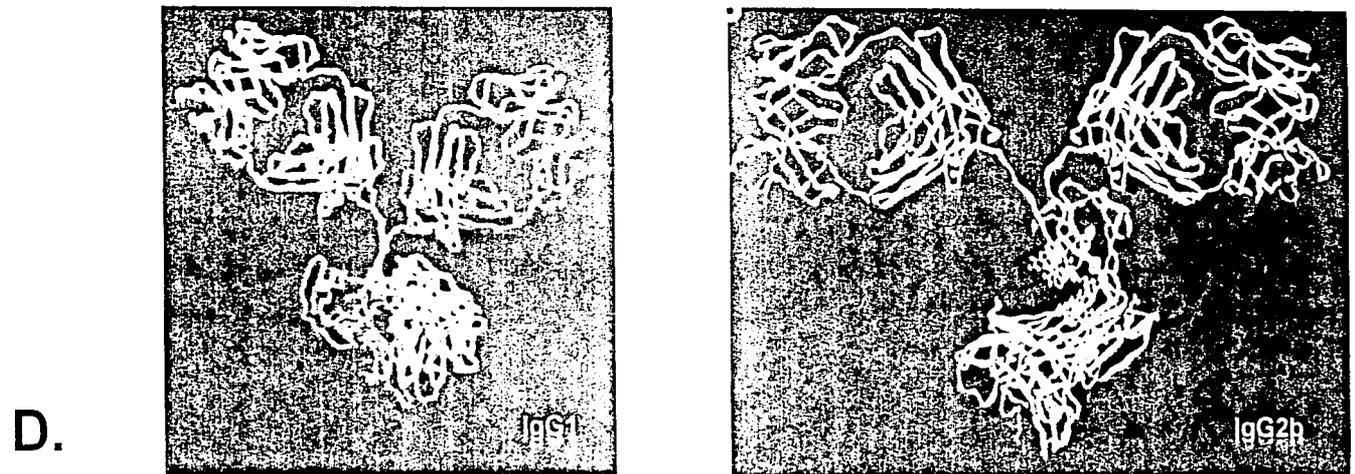
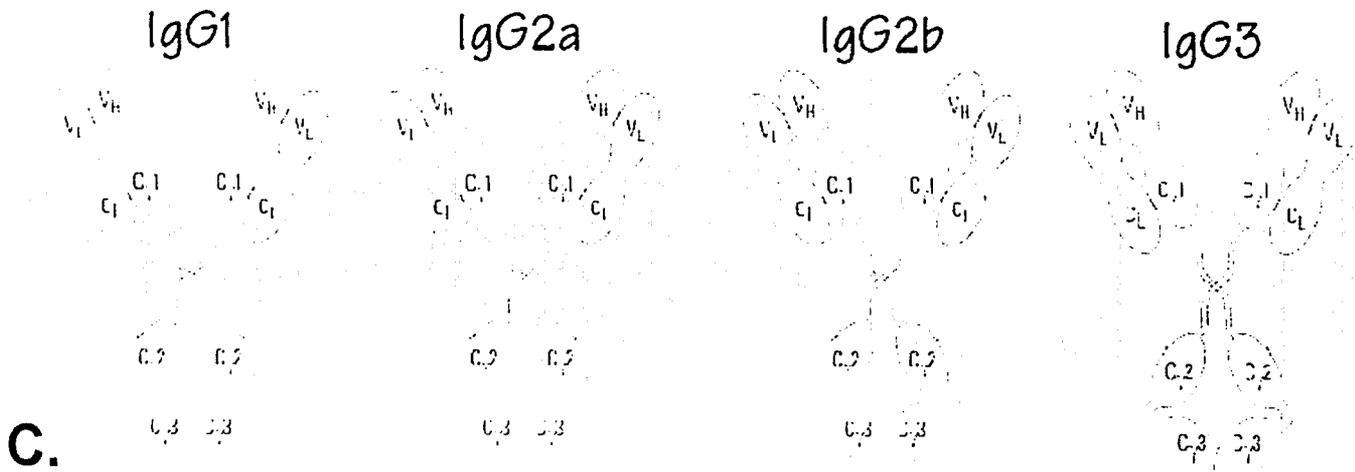


**Figura 3. Las inmunoglobulinas.** A. Las inmunoglobulinas están formadas por dos cadenas pesadas, y dos ligeras unidas entre sí por puentes disulfuro. Las inmunoglobulinas interactúan a través de su porción Fab con el antígeno y a través de su porción Fc con receptores de membrana presentes en las células del sistema inmunológico (modificado de Klein<sup>11</sup>). B. Flexibilidad que exhiben cada uno de los segmentos de las inmunoglobulinas con respecto a la bisagra (modificado Paul<sup>12</sup>).

TESIS CON FALTA DE ORIGEN

A.

B.



TESIS CON  
 FALTA DE ORIGEN

11

flexibilidad entre los segmentos y que presenta la forma típica en Y de las inmunoglobulinas (Fig. 3D). También se determinó que el ángulo entre los Fab es de  $115^\circ$  y que el Fc está orientado de manera oblicua a  $107^\circ$  con respecto al plano de los Fab. Además, los sitios de unión al antígeno están separados por 118 Å. Las inmunoglobulinas de esta subclase presentan la región bisagra más corta. El tipo de aminoácidos contiguos a la zona de la bisagra superior definen la flexibilidad de este segmento. En solución esta zona se inmoviliza por la disposición específica de los Fab. El centro de la región bisagra también se estabiliza por contactos intramoleculares entre residuos de esta zona con una asa del dominio  $C_H2^{24}$ . Las cisteínas del centro de la bisagra del anticuerpo 61.1.3 son las que forman los puentes disulfuro intracadena. Por otra parte, la IgG2a presenta residuos de aminoácidos que aunque genéticamente forman parte del dominio  $C_H2$  estructuralmente forman parte de la región inferior de la bisagra. Este segmento es claramente la porción más móvil de la bisagra. La región de la bisagra completa tiene una extensión de 50 Å y por estudios de resonancia magnética nuclear se determinó que presenta distintas conformaciones, lo que sugiere que la región bisagra en las inmunoglobulinas de esta subclase no se comporta como tal, sino como una "cadena" que une al Fc con los Fab. Al parecer, en solución este anticuerpo presenta distintos estados estructurales que varían entre la forma de T y la de Y como consecuencia de la movilidad intrínseca de sus dominios (Fig. 3D). Los ángulos que presentan las inmunoglobulinas de esta subclase son muy diferentes a los de las IgG1. El ángulo de la región bisagra entre el Fc y el Fab es de  $66^\circ$  y entre el Fc y el Fab es de  $113^\circ$ . Estas diferencias indican que la conformación molecular entre las inmunoglobulinas de estas subclases es muy distinta<sup>25</sup>.

Al comparar la secuencia de las distintas subclases murinas y humanas se determinó que la subclase IgG1 murina comparte un ancestro con las cuatro subclases humanas; mientras que, la subclase IgG2b presenta un ancestro distinto. Lo anterior sugiere que los genes de las subclases IgG1 e IgG2 divergieron antes del proceso de especiación. En humano no hay una subclase equivalente a la IgG2 murina; al parecer, durante la evolución de estas especies, a través de un proceso de contracción, se perdió el gen<sup>26</sup>.

### **Receptores involucrados en el reconocimiento del antígeno**

Los receptores para la porción Fc de la inmunoglobulinas clase G (Fc $\gamma$ R) y el receptor para la porción Fc de la inmunoglobulinas clase E (Fc $\epsilon$ R) se agrupan con los receptores de membrana involucrados en el reconocimiento del antígeno que incluyen a los receptores de antígeno de las células B (BCR, por sus siglas en inglés) y los receptores de antígeno de las células T (TCR, por sus siglas en inglés). Se agruparon de esa manera porque sus características estructurales y mecanismos bioquímicos de activación celular son similares. Este conjunto de receptores se denominó como receptores multicadena de reconocimiento inmune (MIRR, por sus siglas en inglés)<sup>27</sup> (Fig. 4).

Los MIRR están constituidos por subunidades que unen al ligando y subunidades asociadas. Las cadenas involucradas en reconocer al ligando tienen en su región extracelular dominios de inmunoglobulina<sup>27</sup> (Fig. 4). Las subunidades asociadas tienen en su región citoplasmática estructuras supersecundarias involucradas en la activación de respuestas celulares, que están compuestas por pares de tirosinas y leucinas o

isoleucinas dentro de la secuencia consenso  $Y_{xx}L/I(x)_{7-12}Y_{xx}L/I$  (donde X representa residuos no conservados). Esta secuencia es designada como ITAM (por sus siglas en inglés immunoreceptor tyrosine-based activation motif)<sup>28</sup> (Fig. 4).

Los  $Fc\gamma RI$  y  $Fc\gamma RIII$  son receptores para IgG multiméricos, presentan una cadena que une al ligando y cadenas asociadas involucradas en la transducción de señales. Los  $Fc\gamma RII$  son receptores para IgG de una sola cadena, esta cadena contiene en su porción extracelular los dominios de unión a IgG, y en su porción intracelular estructuras supersecundarias involucradas en la transducción de señales<sup>28</sup>.

La importancia de las regiones ITAM radica en que están involucradas en los mecanismos de activación celular. Se ha demostrado en varios sistemas que la capacidad de los receptores para inducir funciones efectoras se anula completamente si los ITAM son eliminados de la proteína<sup>29</sup> o si se cambian (a través de mutación dirigida) los residuos de tirosinas de los ITAM por residuos de fenilalanina<sup>30</sup>. Además, se observó que las respuestas bioquímicas inducidas por receptores quiméricos son idénticas a las inducidas por los receptores intactos. Estos receptores quiméricos están formados por los dominios extracelulares de diversos receptores, y los dominios transmembranal y citoplasmático de las cadenas gama o zeta que contienen intactos los residuos que forman al ITAM<sup>31</sup>.

Los MIRR no tienen actividad intrínseca de cinasa. La sola ocupación del receptor por su ligando no induce respuestas celulares. Para que estos receptores induzcan respuestas es necesario que sean agregados. Cuando estos receptores son agregados inducen la activación de cinasas de tirosina intracelulares, las cuales fosforilan los residuos de tirosinas del ITAM. Cuando se utilizaron inhibidores de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

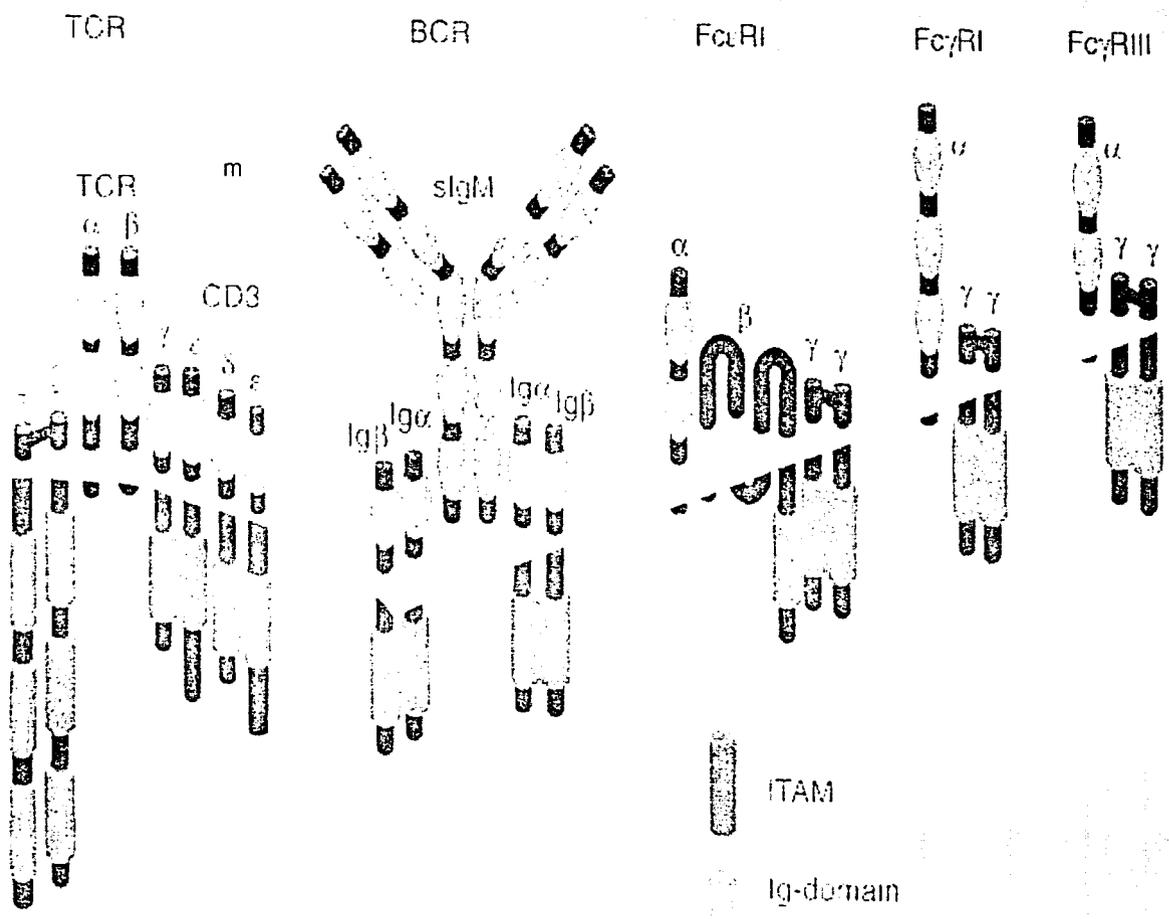


Figura 4. Receptores Multcadena de Reconocimiento Inmune. Esquema que muestra la estructura de los receptores multicadena de reconocimiento inmune (MIRR). Aquí son agrupados el Receptor de antígeno de linfocitos T (TCR), el Receptor de antígeno de linfocitos B (BCR) el receptor de alta afinidad para el Fc de la IgE (Fc $\gamma$ RI) y los Receptores para la porción Fc de la inmunoglobulinas (Fc $\gamma$ R) (tomado de Turner<sup>22</sup>).

TESIS CON  
 FALTA DE ORIGEN

96

cinasas de tirosina se observó que las cadenas que contienen a los ITAM no eran fosforiladas y no se inducían las vías bioquímicas de señalización que generan respuestas celulares<sup>32</sup>.

Las repuestas generadas por los MIRRs participan de modo central en una gran variedad de procesos importantes en el sistema inmunológico. Para comprender cómo la sola agregación de receptores induce la activación de vías bioquímicas intracelulares, se deben definir las propiedades estructurales y/o cinéticas de los agregados del receptor, las características de los complejos protéicos formados como consecuencia de esta agregación y el papel de estos agregados en la transducción de señales.

En el estudio de las respuestas celulares inducidas por la agregación de estos receptores se han empleado anticuerpos monoclonales específicos para la porción extracelular de los receptores, los cuales al inducir la agregación estimulan la respuesta celular. Esto ha permitido descifrar parte de las cascadas bioquímicas generadas y los requerimientos mínimos para activar a la célula. También se ha podido confirmar que cualquier ligando que sea capaz de inducir la agregación de los receptores genera respuestas celulares. Sin embargo, no hemos logrado entender cómo las diferencias en los agregados (en su estructura, tamaño, vida media, etc) afectan el proceso. Una posible respuesta es que diferencias en la configuración espacial de los agregados del receptor se reflejen en su capacidad para inducir la activación celular<sup>33</sup>. Algunos resultados experimentales apoyan esta hipótesis:

Al agregar al BCR usando antígeno, anticuerpos anti-inmunoglobulina (Ig) o anticuerpos anti-Ig unidos a una fase sólida se generan repuestas distintas<sup>34-36</sup>. Lo mismo ocurre si se agrega al TCR usando anticuerpos que reconocen distintos epitopes del complejo CD3, que es una de las subunidades del TCR. Sin embargo, estas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

diferencias casi desaparecen al entrecruzar los anticuerpos con un segundo anticuerpo que los reconozca<sup>37</sup>.

Si la estimulación involucra al Fc $\epsilon$ RI y se usan anticuerpos que reconocen distintos epítopes de la subunidad  $\alpha$  del receptor, también se inducen distintas respuestas. Las respuestas se igualan a la respuesta generada por el antígeno si se usan fragmentos Fab de estos anticuerpos que generan dímeros del receptor y después se entrecruzan usando un segundo anticuerpo que reconozca los fragmentos<sup>38</sup>. Este fenómeno se observó al analizar distintas funciones efectoras como son la secreción de serotonina y la producción de ácido araquidónico y de leucotrieno C<sub>4</sub><sup>39</sup>. Al analizar la movilidad rotacional de los complejos anticuerpo-Fc $\epsilon$ RI formados por cada anticuerpo sobre la membrana de la célula, se determinó que existe una relación inversa entre la movilidad del complejo Fc $\epsilon$ RI-anticuerpo anti-Fc $\epsilon$ RI y la secreción; es decir, complejos Fc $\epsilon$ RI-anticuerpo que presentaron mayor movilidad rotacional fueron los menos eficientes para inducir secreción<sup>40</sup>. Estos datos sugieren que las diferencias observadas en los ensayos de secreción están asociadas a la organización de los dímeros de Fc $\epsilon$ RI formados por cada anticuerpo. Las diferencias estructurales entre los dímeros se reflejan en la forma en que activan vías de señalización involucradas en la síntesis de inositol 1,4,5- trifosfato, la movilización de Ca<sup>2+</sup> y la formación de puntos de adhesión focal. Al analizar las respuestas bioquímicas inducidas por estos anticuerpos se identificó un paso de regulación en las señales inducidas por el Fc $\epsilon$ RI desconocido hasta ese momento que involucra la disociación de la cinasa Lyn de los complejos de los receptores agregados<sup>41</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Estos resultados apoyan la idea de que no hay una relación simple entre el número de receptores agregados y la respuesta efectora, sino que la presencia y/o ausencia de factores que afectan la conformación del agregado contribuyen a determinar el tipo de respuesta.

### **Características moleculares de los receptores para inmunoglobulinas**

Los receptores para inmunoglobulinas mejor caracterizados son los receptores para IgE (Fc $\epsilon$ RI) y para IgG (Fc $\gamma$ R). Los Fc $\gamma$ RI y III están formados por las subunidades FcR $\alpha$  y FcR $\gamma$ . Los Fc $\gamma$ RII son receptores que presentan sólo una cadena. La subunidad FcR $\alpha$  es una molécula transmembranal que tiene dos o tres dominios extracelulares de Inmunoglobulina de tipo variable (tipo-V) y es la encargada de unir al ligando<sup>42</sup>. La cadena FcR $\gamma$  es una molécula transmembranal con una porción citoplasmática donde se localiza el ITAM y que se expresa como homodímero. La cadena FcR $\alpha$  y el dímero de cadenas FcR $\gamma$  se asocian a través de interacciones no covalentes. En el mastocito, el complejo FcR $\alpha$ /FcR $\gamma$ <sub>2</sub> del receptor Fc $\epsilon$ RI se asocia además con una subunidad FcR $\beta$ .

Los FcR reconocen con alta o baja afinidad a su ligando. Los FcR de alta afinidad pueden unir inmunoglobulinas monoméricas, como los receptores para IgE, IgG e IgA. Estos receptores tienen una constante de afinidad del orden de  $10^9$ - $10^{10}$  M<sup>-1</sup> para el Fc $\epsilon$ RI en mastocito, de  $10^8$  M<sup>-1</sup> para los receptores Fc $\gamma$ RI en macrófago y de  $5 \times 10^7$  M<sup>-1</sup> para el Fc $\alpha$ R en monocito. Los FcR de baja afinidad, como son Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII, no unen inmunoglobulinas monoméricamente con una afinidad mensurable<sup>43</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Receptores para IgG

Distintos tipos celulares expresan Fc $\gamma$ R, como linfocitos T activados, linfocitos B, monocitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, células cebadas y células asesinas naturales<sup>43</sup>.

Los Fc $\gamma$ R son un grupo heterogéneo de moléculas. Basándose en su secuencia de aminoácidos y en su afinidad por el ligando, se han clasificado en tres tipos: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII y dentro de cada tipo existen diversas isoformas<sup>17</sup> (Fig. 5).

Los Fc $\gamma$ R tienen dominios extracelulares que unen al ligando y están relacionados estructuralmente. Cada miembro de esta familia es una glicoproteína integral de membrana (Fig. 5), con excepción del Fc $\gamma$ RIIIB expresado en neutrófilos humanos, el cual está anclado a la membrana por un enlace a glucosilfosfatidilinositol (GPI)<sup>17</sup>.

Fc $\gamma$ RI (CD64). Receptor de alta afinidad para IgG.

El receptor Fc $\gamma$ RI (CD64) es el único tipo de receptor para IgG que une IgG monomérica. Es codificado por un solo gen, ubicado en el cromosoma 1 (q21-23), y se han identificado tres distintos transcritos. Se expresa en monocitos y macrófagos y su expresión se induce en neutrófilos por tratamiento con INF- $\gamma$ <sup>43,44</sup>. El Fc $\gamma$ RI expresado en células humanas tiene seis sitios de glicosilación; mientras que el Fc $\gamma$ RI expresado en células de ratón tiene cinco, los pesos moleculares aparentes de estos receptores son de 72 y 67 kDa respectivamente. Contiene en su región extracelular tres dominios de inmunoglobulina, de los cuales los dos primeros son homólogos a los del Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. El tercer dominio podría estar involucrado en la alta afinidad del receptor. El

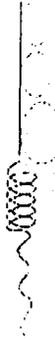
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Fc $\gamma$ RI (CD64)

Cadenas asociadas

Cadena

Homodímero de cadenas  $\gamma$



## Fc $\gamma$ RII (CD32)

IIb<sub>1</sub> IIb<sub>1</sub>' IIb<sub>2</sub>

## Fc $\gamma$ RIII (CD16)

Cadenas asociadas

Cadena

Homodímero de cadenas  $\gamma$

IIIa

III $\gamma$



ITIM



ITAM

Dominio inmunoglobulina



Porción transmembranal

Figura 5. Receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas clase G, Fc $\gamma$ R. Esquema de la estructura y organización entre las subunidades de los Fc $\gamma$ R murinos. La porción extracelular de la cadena  $\gamma$  de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIII y la porción extracelular de los receptores Fc $\gamma$ RII reconoce al ligando (IgG). Las cadenas asociadas de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIII o bien la porción intracitoplasmática de los receptores Fc $\gamma$ RII están involucrados en transducir la señal de activación generada tras la agregación. En la transducción de señales está involucrada las secuencias consenso ITAM (por sus siglas en inglés, immunoreceptor tyrosine activation motif) o bien la secuencia ITIM (por sus siglas en inglés, immunoreceptor tyrosine inhibition motif). (modificado de Deo<sup>17</sup>)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fc $\gamma$ RI se encuentra asociado a dímeros de cadena  $\gamma$  que contienen secuencias ITAM<sup>43</sup> (Fig. 5).

Fc $\gamma$ RII (CD32). Receptor de baja afinidad para IgG.

A diferencia de otros receptores Fc $\gamma$ , los receptores de este grupo constan de una sola cadena, que contiene en su región extracelular el sitio de unión de IgG, y en la parte citoplasmática secuencias involucradas en la activación (Fig. 5). Los receptores Fc $\gamma$ RII son sialoglicoproteínas de 40 kDa, con dos dominios extracelulares tipo inmunoglobulina. En el ratón, hay dos genes (A y B) que codifican para los receptores de este grupo. El gen B produce tres RNAm distintos, denominados b1, b1' y b2<sup>43</sup> (Fig. 5). Los tipos b1 y b2 son generados por el procesamiento alternativo de los exones que codifican la región citoplasmática del receptor. En el ratón se presenta una isoforma adicional al tipo b1, la forma b1'. Esta forma se da como resultado del uso de un sitio críptico de donación para el procesamiento alternativo de los exones, que se encuentra en el primer exón intracitoplasmático. La forma b1 se expresa en células del linaje linfoide, la b2 en células del linaje mielóide y la forma b1' en ambos linajes. Ambas formas contienen cuatro sitios de glicosilación y su peso molecular aproximado es de 40 y 60 kDa respectivamente. Cuando estos receptores son activados por ligandos multivalentes pueden mediar endocitosis y fagocitosis<sup>43</sup>.

El Fc $\gamma$ RII (CD32) en humanos está codificado por tres genes localizados en el cromosoma 1 designados A, B y C. Se han identificado distintas isoformas derivadas de los tres genes. Contiene dos o tres sitios de glicosilación y su peso molecular aparente es de 40 kDa. Los Fc $\gamma$ RIIa y Fc $\gamma$ RIIc se expresan preferentemente en macrófagos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

monocitos y neutrófilos, mientras que el Fc $\gamma$ RIIb se encuentra en linfocitos T y B, neutrófilos, monocitos y macrófagos<sup>17</sup>.

El tallo citoplasmático de la cadena única de los Fc $\gamma$ RIIa y Fc $\gamma$ RIIc contiene el ITAM. Los Fc $\gamma$ RIIb, tanto en humanos como en ratón, no contienen la secuencia ITAM, sino que contienen una secuencia que se ha denominado dominio de inhibición basado en tirosina, ITIM (de las siglas en inglés de immunoreceptor tyrosine inhibitor motif). Esta secuencia está involucrada en la regulación negativa del receptor de antígeno de linfocitos B<sup>17,31</sup>, y de los Fc $\gamma$ R que señalizan a través de los ITAM.

Fc $\gamma$ RIII (CD16). Receptor de baja afinidad para IgG.

El receptor murino Fc $\gamma$ RIII está codificado por un solo gen, ubicado en el cromosoma 1, el cual origina un solo transcrito (Fig. 5). El Fc $\gamma$ RIII está asociado a homodímeros o heterodímeros de las cadenas  $\gamma$  ó  $\zeta$ , que son necesarios para que el receptor se exprese en la membrana<sup>43</sup>.

Las formas expresadas en humano son dos y se designan CD16: Fc $\gamma$ RIIIa y Fc $\gamma$ RIIIb, productos de dos genes distintos A y B. El primero codifica para una proteína transmembranal que está asociada a homodímeros o heterodímeros de las cadenas  $\gamma$  ó  $\zeta$ , mientras que el segundo codifica para una proteína que se ancla a la membrana plasmática por un glicosilfosfatidilinositol (GPI). No se han encontrado cadenas asociadas al Fc $\gamma$ RIIIb, aunque sí se ha observado que coopera en la señalización a través de otros receptores<sup>46</sup>. El Fc $\gamma$ RIIIa es expresado en macrófagos, monocitos activados, células NK, células preB y células T. El Fc $\gamma$ RIIIb se expresa exclusivamente en neutrófilos<sup>43</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Interacción entre Fc $\gamma$ Rs e inmunoglobulinas

### El mapeo del sitio de unión para la IgG

La región bisagra contiene una secuencia polipeptídica codificada por el exón del dominio C $\mu$ 2 que se denomina bisagra baja. Es en esta zona donde se localiza el sitio de unión para el Fc $\gamma$ RI humano<sup>47</sup>. Al parecer, es la misma región la que está involucrada en el reconocimiento entre la inmunoglobulina y los receptores Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII murinos<sup>48</sup>. Al analizar por resonancia magnética nuclear (NMR) la interacción entre el fragmento Fc de una IgG2b y el receptor Fc $\gamma$ RII murino en su forma soluble se determinó que eran los residuos Ala231, Leu234, Tyr296 e Ile300, presentes en la región baja de la bisagra de la inmunoglobulina, los que mostraban cambios en el espectro de resonancia. Al calcular el potencial electrostático de la superficie molecular del fragmento Fc se determinó que el sitio de unión era una zona cargada negativamente. Esto resulta muy trascendente cuando se recuerda que el área putativa de interacción con la inmunoglobulina en el receptor contiene varios residuos de aminoácido básicos. Cuando se compararon los espectros de resonancia magnética nuclear de fragmentos Fc marcados con [1-<sup>13</sup>C]Leu se observó que cuando la inmunoglobulina interacciona con el Fc $\gamma$ RII la resonancia del residuo Leu234 cambia completamente de su posición original, y se podía localizar en otras dos posiciones. Este resultado sugiere que la unión entre la inmunoglobulina y el receptor induce cambios conformacionales en la región baja de la bisagra. Es muy posible que la flexibilidad de la región bisagra facilite la interacción entre la inmunoglobulina y el receptor<sup>49-50</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## La interacción entre las distintas subclases de IgG y los Fc $\gamma$ R

El primer esquema de interacción entre las distintas subclases de IgG murinas y los distintos tipos de receptores Fc $\gamma$ R señalaba que las subclases IgG1 e IgG2b interactuaban preferentemente con los receptores Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII y que las subclases IgG3 e IgG2a lo hacían con el receptor de alta afinidad, el Fc $\gamma$ RI. Estos patrones de interacción se definieron usando líneas celulares transfectadas<sup>47</sup>. La contribución precisa de cada subclase de IgG y de cada clase de receptor en la respuesta *in vivo* no puede esclarecerse de esa manera.

Utilizando ratones con deficiencia homociga para los receptores FcR se ha facilitado la evaluación del papel de cada subclase en la respuesta inmune. De esta manera se ha podido definir que el receptor Fc $\gamma$ RI murino es el único que puede unir con alta afinidad a las subclases IgG2a e IgG3. Los ratones Fc $\gamma$ RI<sup>-/-</sup> no pueden eliminar complejos inmunes formados con IgG3 y disminuye considerablemente la eliminación de los complejos inmunes formados con IgG2a. Los estudios realizados en estos ratones muestran que el receptor Fc $\gamma$ RI es más eficiente que los demás FcRs para mediar endocitosis de complejos inmunes solubles de IgG, fagocitosis y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. En comparación con los ratones silvestres, en los ratones Fc $\gamma$ RI<sup>-/-</sup> disminuye considerablemente el proceso inflamatorio *in vivo*. En ratones Fc $\gamma$ RI<sup>-/-</sup> se da la fagocitosis mediada por la IgG2ab y se presume que este proceso se da a través del receptor Fc $\gamma$ RIII que une complejos de esta subclase de manera casi idéntica en términos cuantitativos, a como lo hace el receptor Fc $\gamma$ RI<sup>51</sup>.

La IgG1 activa distintas funciones efectoras vía Fc $\gamma$ RIII. Los macrófagos de ratones Fc $\gamma$ RIII<sup>-/-</sup> no pueden fagocitar partículas opsonizadas con IgG1. Diversas

funciones efectoras como la fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG1 *in-vitro* o *in vivo* (analizando la progresión de la anemia hemolítica autoinmune), la eliminación de complejos inmunes formados con IgG1 por células dendríticas y la anafilaxia cutánea pasiva, no se llevaban a cabo en ratones FcγRIII<sup>-/-</sup>. Estos fenómenos se observaron aun cuando se utilizaban distintos anticuerpos monoclonales de la subclase IgG1. Macrófagos de ratones FcγRIII<sup>-/-</sup> pueden fagocitar partículas opsonizadas con IgG2b; pero la IgG2b no es capaz de activar anafilaxia cutánea pasiva, lo que indica que esta subclase puede interactuar con diferentes receptores<sup>52</sup>.

### **Señales inducidas por la agregación de los FcγR que conducen a la fagocitosis.**

Cuando una célula encuentra una partícula opsonizada con IgG, los FcγR que expresa reconocen la porción Fc de las inmunoglobulinas. Esta interacción agrega a los receptores en la zona de reconocimiento. La sola agregación es capaz de inducir señales bioquímicas que provocan respuestas celulares<sup>43</sup>.

La reacción bioquímica más temprana y común tras la agregación de los FcγR es la fosforilación de los residuos de tirosina presentes en las secuencias ITAM<sup>43</sup> (Fig. 6). Los residuos de tirosina de las secuencias ITAM son fosforilados por cinasas de tirosina de la familia Src. A estos sitios fosforilados se ancla la cinasa Syk, y es fosforilada por las cinasas de la familia Src y, en consecuencia, activada.

Se han identificado una serie de eventos bioquímicos intracelulares que siguen a la activación de las cinasas Src y Syk, que sólo se conocen parcialmente. Se observa la activación de la cinasa de Bruton (Btk) y Emt, la cinasa de adhesión focal (FAK), la

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

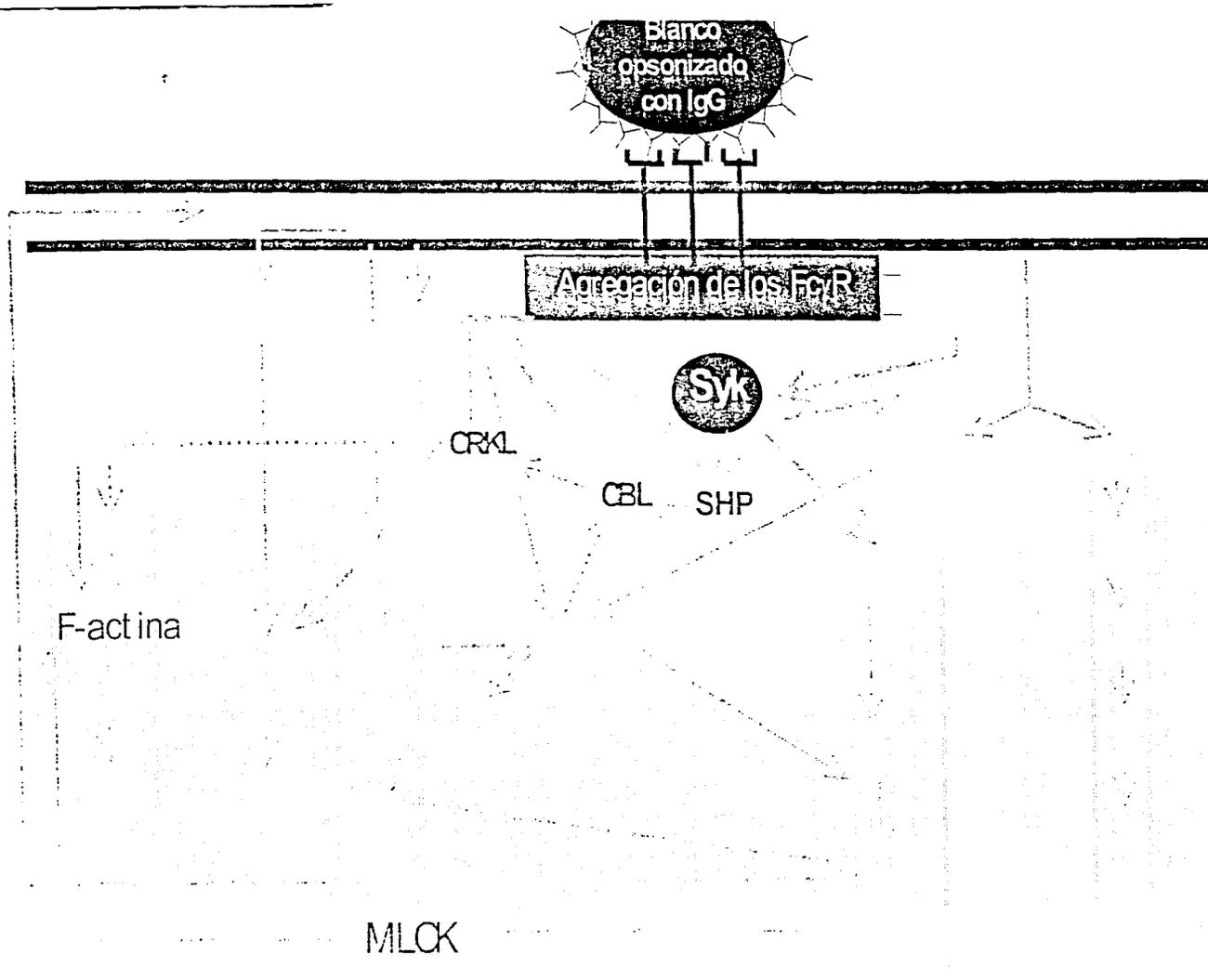


Figura 6. Señales bioquímicas iniciadas por el entrecruzamiento de los Fc $\gamma$ R. El entrecruzamiento de los Fc $\gamma$ R induce la activación de cinasas de la familia Src y de la familia Syk. Cinasas de la familia Src fosforilan y se asocian a las tirosinas (Y) de los motivos ITAM y activan a Syk. A su vez Syk activa a distintas enzimas involucradas en distintas funciones celulares. Fc $\gamma$ R, Receptores para IgG; PI3K, Fosfatidilinositol 3-cinasa; Fosfolipasa C $\gamma$ , PLC $\gamma$ ; Fosfolipasa D, PLD; Fosfolipasa fagocítica, pPLA $_2$ ; Fosfatidato fosfohidrolasa, PPH; Proteína Cinasa C, PKC; Cinasa activada por mitógenos, MEK; Cinasa regulada por señales extracelulares, ERK; Cinasa de la cadena ligera de la miosina, MLCK; Diacilglicerol, DAG; Ácido fosfatídico, PA; Fosfatidilcolina, PC; Ácido araquidónico, AA; Iones calcio, [Ca $^{2+}$ ]; Fosfatidilinositol trifosfato, PIP $_3$ ; Fosfatidilinositol bifosfato, PtdInsP $_2$ ; inositol trifosfato, IP $_3$ ; Substrato para PKC rico en residuos de alanina y miristoilado, MARK; Proteína del linfoma de linaje B-casitas, Cbl; Proteína relacionada al oncogene Crk, CRKL; Proteína fosfatasa con dominios SH2, SHP.

proteína cinasa C (PKC), la proteína cinasa A (PKA) y la vía de señalización de la cinasa activada por mitógenos, ERK. También participan la cinasa de 3-fosfatidilinositol (PI 3-K) y la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), la fosfolipasa C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1) y la fosfolipasa D (PLD)<sup>43</sup> (Fig. 6). Las relaciones causales, temporales y de modulación recíproca entre estas enzimas, así como su relación con las vías específicas de señalización de los distintos FcR, varían dependiendo del receptor que es activado, del tipo de célula que es estimulada, así como del estado de maduración y activación celular<sup>53</sup>.

Los Fc $\gamma$ R generan señales que estimulan funciones celulares como diferenciación, expresión génica y síntesis de proteínas<sup>31</sup>. Estos receptores median funciones efectoras como la endocitosis de complejos inmunes, citotoxicidad mediada por anticuerpos, la liberación de moléculas con actividad proinflamatoria, inmunomoduladora, citotóxica y antimicrobiana y fagocitosis<sup>54</sup>. La fagocitosis está involucrada en la destrucción de microorganismos y la eliminación de complejos inmunes y células apoptóticas sin que sean dañadas células aledañas<sup>55</sup>. Aunque la fagocitosis como proceso celular involucrado en la defensa contra patógenos se describió desde principios del siglo XIX<sup>56-57</sup>, aún hoy no se conocen todos los detalles del mecanismo bioquímico que la dirigen. La complejidad del estudio de las vías bioquímicas involucradas en la fagocitosis *in vivo* se debe, en parte, a que los distintos Fc $\gamma$ R son capaces de estimular la fagocitosis, a las interacciones entre ellos y entre las vías de señalización que activan<sup>16,58</sup>.

Algunas señales iniciadas con la agregación de los receptores conducen al rearreglo del citoesqueleto<sup>59</sup>. Durante la fagocitosis se requiere de la polimerización de

actina en el sitio de ingestión. En células tratadas con citocalasina B (compuesto que inhibe la polimerización de la actina), no se observó fagocitosis<sup>60</sup> y en macrófagos donde se utilizó faloidina-rodamina para visualizar la actina polimerizada, se observó que polimerizaba en los pseudópodos después de 2 min de estar en contacto con eritrocitos opsonizados con IgG<sup>61</sup>. Los mecanismos por los cuales los Fc $\gamma$ R estimulan la polimerización de actina e inducen la formación del fagosoma no se conocen del todo; al parecer participan proteínas como la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI-3 K), GTPasas de la familia de Rho, la proteína cinasa C (PKC) y proteínas motor como la miosina I<sup>61-62</sup>. Componentes del citoesqueleto que participan en procesos de adhesión, también lo hacen durante la extensión de la membrana en la fagocitosis, estos incluyen proteínas como paxilina, talina<sup>51</sup>, vinculina,  $\alpha$ -actinina, proteína cinasa C $\alpha$ , MARCKS y MacMARCKS<sup>63-64</sup>.

#### **La actividad de cinasas de tirosina en la fagocitosis. Las cinasas de las familia Src y Syk.**

La fosforilación de los residuos de tirosina de ITAM se relaciona con la activación de proteínas con actividad de cinasas de tirosina (PTK), pertenecientes a distintas familias. Las primeras cinasas activadas pertenecen a la familia Src<sup>55</sup>, cuyo aumento en actividad ha sido demostrado tras la agregación de los Fc $\gamma$ R<sup>66-70</sup>. Los fagocitos expresan a por lo menos seis miembros de la familia Src: Fgr, Fyn, Hck, Lyn, Yes y Src<sup>71-72</sup>. Las enzimas de esta familia permanecen inactivas a través de la interacción entre un residuo de tirosina fosforilado localizado hacia la porción C-terminal y el dominio SH2 (de las siglas en inglés de Src homology-2), un dominio que

tiene la capacidad de reconocer y unirse a residuos de tirosina fosforilados. Esta interacción causa que la enzima se pliegue sobre sí misma y bloquee su sitio catalítico. Al parecer, la activación de las enzimas de la familia Src involucra la actividad de una fosfatasa, en el caso de leucocitos podría estar involucrada la fosfatasa CD45. Durante la activación de estas enzimas también se requiere de la autofosforilación. Aparentemente una pequeña fracción de las cinasas de Src está activa y asociada constitutivamente a la porción citoplasmática del receptor que contiene el ITAM, de manera que la agregación del receptor induce la activación de las cinasas de la vecindad<sup>73</sup>.

Aún no se conoce el papel que juegan estas cinasas durante la fagocitosis. Macrófagos de ratones Src<sup>-/-</sup>, no muestran alteraciones en el proceso de fagocitosis. De igual manera, la fagocitosis en macrófagos Hck<sup>-/-</sup> es normal y solo disminuye en células Lyn<sup>-/-</sup>. Sin embargo, en fagocitos triple deficientes para Hck<sup>-/-</sup>, Fgr<sup>-/-</sup> y Lyn<sup>-/-</sup> la disminución en la fagocitosis es pronunciada, pero aun así el proceso no desaparece<sup>74</sup>. Después de la estimulación con partículas opsonizadas con IgG estas cinasas son activadas y se redistribuyen a la copa fagocítica. Esto podría sugerir que existe cierto nivel de redundancia entre estas cinasas y que todas pueden participar durante la fagocitosis. Sin embargo, recientemente se definió que Fgr, un miembro de esta familia, está involucrado en la regulación negativa de la fagocitosis<sup>75</sup>.

Los residuos de tirosina fosforilados por cinasas de la familia Src, sirven como sitio de anclaje para las cinasas de la familia Syk/ZAP-70. Esta asociación se propone a partir de la coprecipitación de Syk con las cadenas del FcR en varios sistemas<sup>76-79</sup>. La familia Syk/ZAP-70 se caracteriza por presentar un dominio de cinasa C-terminal y dos dominios SH2 contiguos hacia la porción N-terminal, interrumpidos por los

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

interdominios A y B. Entre los dos dominios SH2 se encuentra el interdominio A, el cual forma una asa que es importante para la interacción de la enzima con otras proteínas. Entre el dominio de cinasa y los dominios SH2 se encuentra el interdominio B que contiene varios residuos de tirosina. Cuando estas tirosinas son fosforiladas actúan como sitios de unión para distintas proteínas como la fosfolipasa C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1), Vav y Cbl que podrían ser sustratos de la enzima. Dentro del dominio catalítico se encuentran residuos de tirosina que al ser mutados por fenilalanina generan mutantes activas de la enzima. No se conoce el mecanismo por el cual estos residuos de tirosina regulan la actividad de Syk, pero puede involucrar la actividad de alguna fosfatasa que defosforila estos residuos de tirosina<sup>80</sup>.

A través de sus dos dominios SH2, Syk se asocia a los residuos de tirosina fosforilados del ITAM. Para activar a la cinasa se requiere de esta asociación<sup>72,81-82</sup> y de su fosforilación por cinasas de la familia Src. La activación de Syk es un evento muy importante en la fagocitosis<sup>83</sup>. Si se bloquea la actividad de Syk empleando inhibidores específicos para esta enzima se inhibe la fagocitosis. Tampoco hay fagocitosis si se impide la expresión de Syk usando oligonucleótidos antisentido. Asimismo, macrófagos de ratones Syk<sup>-/-</sup> no pueden fagocitar partículas opsonizadas con IgG<sup>73</sup>. Las variaciones en la capacidad fagocítica de los distintos Fc $\gamma$ R pueden deberse, en parte, a diferencias en su interacción con Syk durante el inicio de la cascada de activación o de la regulación de la enzima<sup>84</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## La fosfatidilinositol 3-cinasa (PI 3-K) y su papel en la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R.

La fosfatidilinositol 3-cinasa (PI 3-K) está involucrada en la señalización a través de los Fc $\gamma$ R. Esta enzima genera fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP $_3$ ) al fosforilar en la posición D3 al anillo de fosfatidilinositol (PtdIns) y a otras especies fosforiladas de PtdIns, como el PtdIns(4)P y del PtdIns(4,5)P $_2$ , que tienen un papel importante en la señalización<sup>85</sup>. La PI 3-K pertenece a una familia de enzimas homólogas en su dominio catalítico, denominado región de homología 1 (HR1)<sup>86</sup>.

Las PI 3-K se agrupan en tres clases basándose en su selectividad por sustratos específicos en ensayos *in vitro*. Las PI 3-K de clase I son heterodímeros de aproximadamente 200 kDa, compuestos por una subunidad catalítica de aproximadamente 110-120 kDa y una subunidad adaptadora de entre 50-100 kDa. Las enzimas pertenecientes a esta clase son capaces de fosforilar *in vitro* PtdIns, PtdIns(4)P, y PtdIns(4,5)P $_2$ <sup>87</sup>. Sin embargo, en ensayos *in vivo* el sustrato para las PI 3-K de clase I es el PtdIns(4,5)P $_2$ <sup>88</sup>.

Las PI 3-K de clase II son proteínas de entre 170 -210 kDa con un dominio C2 hacia la porción carboxilo terminal que une Ca $^{2+}$ <sup>89</sup>. No se han identificado moléculas adaptadoras y no se conoce la forma de activación de estas enzimas. Las enzimas pertenecientes a esta clase fosforilan *in vitro* PtdIns y PtdIns(4)P<sup>88</sup>.

Las PI 3-K de clase III son homólogas a la proteína Vps34p de *Saccharomyces cerevisiae*. La proteína Vps34p se asocia a la proteína Vps15 que es una cinasa de residuos de serina/treonina<sup>90</sup>. Vps15 recluta a Vps34p a la membrana y la activa como cinasa de lípidos. En mamíferos se clonó una proteína con 30% de identidad con

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Vps15. Esta proteína, llamada p150, actúa como adaptadora para la PI 3-K clase III<sup>89</sup>. El complejo PI 3-KIII-p150 exhibe actividad de cinasa de fosfoinosítidos y de cinasa de residuos de serina/treonina<sup>91</sup>. Fosforilan *in vitro* exclusivamente PtdIns en la posición 3 del anillo, por lo que se ha propuesto que reciba el nombre de cinasa específica para fosfatidilinositol-3 (PtdIns3K)<sup>91</sup>. La actividad de la PI 3-K clase III depende de que sea fosforilada en serina/treonina<sup>92</sup>.

Las PI 3-K de clases I y III están involucradas en la fagocitosis. La actividad de PI 3-K clase III se requiere durante la maduración del fagosoma<sup>93</sup>, mientras que la actividad de PI 3-K de clase I se requiere durante la internalización de la partícula<sup>94</sup>.

Después de la activación celular por agonistas, la PI 3-K de clase I es translocada a la membrana plasmática, ganando así acceso a su sustrato. En este proceso participan las subunidades adaptadoras que pueden asociarse a secuencias de tirosina fosforiladas (clase IA), o bien interactuar con las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas G triméricas (clase IB)<sup>92</sup>.

Las PI 3-K de clase IA presentan una subunidad adaptadora de 50-85 kDa (p85 es el prototipo) asociada constitutivamente a la subunidad catalítica, p110. Hacia la región amino terminal de p85 se encuentra un dominio de homología Src tipo 3 (SH3), seguido por un dominio BH (de las siglas en inglés de breakpoint-cluster-region homology region), que interactúa específicamente con proteínas G monoméricas y que no presenta actividad de GTPasa. Este dominio está flanqueado por dos regiones ricas en residuos de prolina. Hacia la región carboxilo terminal de p85 hay dos dominios SH2. Entre los dominios SH2 se encuentra una región involucrada en la unión con la subunidad catalítica, denominada región inter-SH2 (iSH2)<sup>92</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La subunidad catalítica, p110, contiene un dominio de unión a p85, una región para la asociación con Ras<sup>95</sup>, un dominio de cinasa de PtdIns [PIK, región conservada entre las PI 3-K<sup>96</sup>], y el dominio de cinasa de proteínas en residuos de serina y treonina que se ubica hacia la porción carboxilo terminal<sup>97</sup>. La actividad de cinasa en residuos de serina y treonina de la PI 3-K de clase IA le permite fosforilar a la subunidad adaptadora en la región iSH2 y con ello regular la actividad de cinasa de lípido de la subunidad catalítica<sup>98</sup>.

En mamíferos existen tres isoformas de la subunidad catalítica, mientras que existen siete isoformas de la subunidad reguladora. Las subunidades p110 $\alpha$  y  $\beta$  están ampliamente distribuidas en todo el organismo, mientras que la subunidad p110 $\delta$  se encuentra principalmente en leucocitos<sup>91</sup>.

Al menos una isoforma de PI 3-K de clase IA se expresa en todos los tipos celulares de mamíferos y está involucrada en la activación celular. La cantidad de PI 3-K activa aumenta con la estimulación de receptores que inician cascadas de fosforilación en residuos de tirosina<sup>95</sup>. Las PI 3-K de clase IA están involucradas en la fagocitosis<sup>99</sup>. Las PI 3-K de clase IB son activadas por la estimulación de receptores para quimioatrayentes<sup>100</sup>.

La enzima PI-3K está involucrada en la señalización mediada por los Fc $\gamma$ R<sup>101</sup>. Durante la fagocitosis, la actividad de PI 3-K clase IA permite la extensión de los pseudópodos y la formación del fagosoma. En neutrófilos y macrófagos tratados con wortmanina (compuesto que inhibe a la PI 3-K) se inhibe la fagocitosis mediada por Fc $\gamma$ R<sup>85</sup>. En estos casos el macrófago es capaz de unir a la partícula opsonizada; sin embargo, no es capaz de internalizarla pues no ocurre la extensión de los

pseudópodos. El arresto en la fagocitosis no se elimina si se disminuye el número de partículas. Pero si se disminuye el tamaño de la partícula, y con ello la magnitud en la extensión del pseudópodo necesario para su internalización, se atenúa el efecto de la wortmanina<sup>85,94,102-103</sup>. El papel de PI 3-K en la fagocitosis podría ser producir PI(3,4,5)P<sub>3</sub> que ayuda a reclutar proteínas involucradas en reorganizar el citoesqueleto de actina. Este producto se acumula en los sitios en donde se está formando el fagosoma. Algunas candidatas son las proteínas Vav y ARNO<sup>104</sup>, la profilina y la gelsolina, PLC $\gamma$ 1, la proteína cinasa B/Akt<sup>85</sup> y la miosina X<sup>105</sup>.

#### **La cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y su papel en la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R.**

La cinasa de tirosina ERK está involucrada en la señalización a través de los Fc $\gamma$ R. Esta cinasa pertenece a la familia de las cinasas activadas por mitógenos o MAP cinasas (MAPK). Las MAPK son una familia multigénica de cinasas citosólicas de residuos de serina/treonina. La actividad de estas cinasas se ha asociado a la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis y otros procesos celulares<sup>106</sup>. Las MAPK son las enzimas terminales de una serie de cinasas que se activan una a la otra de manera secuencial, a través de fosforilaciones, para propagar una cascada de activación celular. Estas cinasas sirven para amplificar y mantener la fidelidad de la cascada de activación, pues son selectivas en las interacciones con sus activadores y con sus substratos.

Una característica que permite distinguirlas como MAPK es la presencia de una estructura de fosforilación en residuos de serina/treonina: TXY, donde X puede ser un

residuos de glutamina, prolina o glicina. Las MAPK son activadas a través de fosforilaciones en residuos de treonina y de tirosina, por un grupo específico de cinasas duales: las cinasas de MAP cinasa, también llamadas MEK<sup>107</sup>. La selectividad en las interacciones con sus activadores y con sus substratos está dada por la secuencia de residuos de la estructura de fosforilación dual y es influenciada por el asa de unión. En células de mamífero se han descrito cuatro clases de MAPK, que incluyen: las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK-1 y ERK-2, también llamadas p42 y p44 MAPK); las cinasas para la porción amino terminal *c-Jun* (JNK), también llamadas cinasas activadas por estrés (SAPK); la MAP cinasa p38 y la MAP cinasa grande-1 (BMK-1)<sup>108</sup>.

Las cinasas ERK son activadas en respuesta a factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); o factores de diferenciación celular, como el factor de crecimiento nervioso (NGF)<sup>108</sup>. En neutrófilos humanos al agregar FcγRIIIa y FcγRIIIb, se estimula la actividad de ERK<sup>109</sup>. La activación de la vía de ERK involucra la comunicación entre el receptor y la vía de Ras, a través de la formación de complejos multiméricos entre proteínas adaptadoras y factores de intercambio de nucleótidos de guanina. En la activación mediada por FcγR se ha observado el ensamblaje de la proteína adaptadora Grb2 y la proteína intercambiadora de GTP: SOS. Grb2/SOS conducen a la activación de proteínas G de bajo peso molecular como Ras, Rac y Rho<sup>27</sup>. Sin embargo, se ha propuesto la existencia de vías alternas para la activación de ERK, que no involucran a Ras<sup>110-112</sup>.

En la vía clásica de activación de las MAPK, cuando Ras es activada se asocia a la porción amino terminal de la cinasa de serina/treonina Raf-1 que la coloca en proximidad de la membrana plasmática. Raf-1 es activada por fosforilación (aún no se ha determinado cuál es la cinasa responsable), y su actividad es modulada por cinasas de la familia PKC y PKA. La forma activa de Raf-1 fosforila selectivamente a las tres isoformas de MEK, que a su vez activan selectivamente a las cinasas ERK-1 y ERK-2<sup>107</sup>. Las cinasas MEK, que activan a ERK, constituyen una familia de cinasas de residuos de serina/treonina muy conservadas, que en mamíferos incluyen a tres isoformas homólogas e idénticas en un 85%; MEK-1a (44 kDa), MEK-1b (41 kDa) y MEK-2 (45 kDa). El mecanismo de activación de MEK involucra su fosforilación en residuos de serina<sup>103</sup>. MEK es capaz de fosforilar a ERK-1 y ERK-2 en residuos de treonina y tirosina en una reacción secuencial en donde la fosforilación del residuo de tirosina precede a la del residuos de treonina<sup>114</sup>.

ERK es activada durante la activación de los FcγR, participa en la fagocitosis en neutrófilos<sup>115-116</sup> y en la síntesis de TNFα<sup>117</sup>. Durante la fagocitosis la activación de ERK puede ser el resultado de la activación de PKC o PI-3K. La vía que depende de la activación de PKC involucra a Raf-1 y requiere la translocación de ambas a la membrana plasmática. La vía que depende de PI-3K no se conoce, pero podría estar involucrada la cinasa Akt. La inhibición de ERK empleando al inhibidor PD98059 abate la fagocitosis en macrófagos. El papel de ERK en la fagocitosis puede estar asociado a la activación de la fosfolipasa A2 (PLA2) y la producción de ácido araquidónico (AA)<sup>118</sup>. La producción de AA por macrófagos requiere de la actividad de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ERK<sup>119</sup>. Si se inhibe la producción de AA se impide la fagocitosis que puede reestablecerse si se agrega AA exógeno<sup>120-121</sup>.

ERK también puede estar involucrada en la regulación del reordenamiento del citoesqueleto y la morfología de la célula<sup>118,122-123</sup>. Los sustratos conocidos de ERK incluyen proteínas asociadas a citoesqueleto como la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK)<sup>124</sup>.

### **La proteína cinasa C (PKC) y su papel en la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R.**

La actividad de las proteínas cinasas C (PKC) es necesaria para que se lleve a cabo la fagocitosis inducida por los Fc $\gamma$ R. Estas cinasas se agrupan en una familia de cinasas de residuos de serina/treonina que son activadas por diacilglicerol (DAG), fosfatidilserina (PS) y en el caso de algunas isoformas, por iones Ca<sup>2+</sup>.

Las cinasas de la familia PKC tienen como estructura general cuatro regiones conservadas (C1-C4) y cinco variables (V1-V5). Hacia el extremo amino terminal, precediendo al dominio C1, se encuentra una secuencia pseudosustrato con actividad autoinhibitoria ( $\psi$ S)<sup>125</sup>. El dominio C1 tiene dos dedos de zinc<sup>126</sup>; mutaciones en este dominio han dado evidencia de que éste es el sitio de unión del DAG<sup>127</sup>. El dominio C2 es contiguo a C1 y tiene la capacidad de unir iones Ca<sup>2+</sup><sup>128</sup>. El dominio C2 de las PKC que no responden a Ca<sup>2+</sup> interactúa con proteínas que las ubican en regiones específicas de la membrana; estas proteínas son los receptores para PKCs activadas (RACKs)<sup>129-130</sup>. Las regiones C3 y C4 junto con la región V4 forman el dominio catalítico. El dominio V5 juega un papel importante para la localización subcelular de la enzima. Se piensa que V5 participa en interacciones proteína-proteína, pues productos

generados a partir del gen PKC $\beta$ , que difieren únicamente en la secuencia V5, se localizan en distintos compartimientos membranales, PKC $\beta$ I en los microtúbulos mientras que PKC $\beta$ II en los gránulos secretorios<sup>131</sup>. Dependiendo del arreglo de los dominios, en la familia de PKC se distinguen 11 isoformas y dependiendo de su regulación se agrupan en subfamilias.

La subfamilia de PKC clásicas comprende a las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ I y  $\beta$ II y  $\gamma$ , que contienen todas las regiones conservadas y son activadas por fosfatidilserina (PS) de manera dependiente de Ca<sup>2+</sup>. También unen DAG, que incrementa la especificidad de la enzima por la PS y modula la afinidad por Ca<sup>2+</sup> para situarla en el intervalo fisiológico<sup>132</sup>. La subfamilia de PKC nuevas comprende a las isoformas  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\theta$ , que presentan la región V1 hacia la porción amino terminal junto a la región C1 rica en residuos de prolina, pero carecen de la región de unión a Ca<sup>2+</sup>. Estas isoformas son insensibles a Ca<sup>2+</sup>, pero son activadas por DAG en presencia de PS<sup>133</sup>. La subfamilia de PKC atípicas comprende a las isoformas  $\iota$ ,  $\lambda$  y  $\zeta$ : que carecen de la región C2 y de la mitad de la región C1. Estas isoformas son insensibles a Ca<sup>2+</sup> y no responden a DAG<sup>134</sup>.

La actividad de PKC es necesaria para que se lleve a cabo la fagocitosis inducida por los Fc $\gamma$ R, pues al eliminar el contenido de PKC de la célula, incubándola por tiempos prolongados con ésteres de forbol, se inhibe la fagocitosis; y existe una fuerte correlación entre la cantidad de PKC eliminada y los valores de inhibición de la fagocitosis<sup>135</sup>. Además, algunos substratos de PKC como MARCKS y MacMARCKS y la plecstrina se acumulan en el área perifagosomal durante la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R<sup>64</sup>. Y aunque la actividad de cinasa de la familia PKC es necesaria para que se

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

lleve a cabo la fagocitosis, todavía no es claro que papel juega cada isoforma en el proceso. Tanto isoformas de PKC clásicas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) como de PKC nuevas ( $\epsilon$ ) se translocan a la membrana durante la fagocitosis mediada por los  $Fc\gamma R$ . Sin embargo, la fagocitosis procede normalmente en ausencia de incrementos sustanciales en las señales de  $Ca^{2+}$  intracelular. En estos estudios se determinó la concentración de  $Ca^{2+}$  en  $\leq 2$  nM. Esta concentración es menor a la que requieren las isoformas clásicas de PKC para translocarse a la membrana que requieren una concentración de  $Ca^{2+}$  de 0.8 a 1  $\mu M$ , o para ser completamente activadas que requieren una concentración de  $Ca^{2+}$  de 1.5 a 38  $\mu M$ <sup>136</sup>. Además, cuando las células son tratadas con activadores de PKC, como los esteres de forbol, la fagocitosis mediada por los  $Fc\gamma R$  se incrementa. Esto sugiere que las distintas isoformas podrían estar involucradas en diferentes eventos de la fagocitosis o que participan en distintos eventos inducidos con la agregación de los  $Fc\gamma R$ . Algunos estudios sugieren que las isoformas clásicas de PKC participan en el estallido respiratorio; pues al depletar la célula de  $Ca^{2+}$  este proceso se inhibe pero no la fagocitosis. Y que son las isoformas de PKC nuevas las que participan en la fagocitosis mediada por los  $Fc\gamma R$ , pues este proceso es independiente de  $Ca^{2+}$  y sensible al tratamiento con esteres de forbol<sup>137</sup>.

#### **La regulación de las vías involucradas en la fagocitosis. El papel de CBL y SHP**

La fosfatasa de tirosina SHP regula la fagocitosis mediada por los  $Fc\gamma R$ <sup>138</sup>. Esta fosfatasa pertenece a la familia de fosfatasas de residuos de tirosina (PTP). Las diferencias estructurales entre los miembros de esta familia son grandes pero todos presentan la secuencia  $HGX_2GX_2R$  y utilizan el mismo mecanismo catalítico. Durante

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

la catálisis el residuo de cisteína presente en la secuencia H<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>GX<sub>2</sub>R realiza un ataque nucleofílico sobre el grupo fosfato presente en el sustrato. El residuo de asparagina también está involucrado en la catálisis, primero actúa como un ácido general protonando el grupo fenolato del sustrato y después actúa como una base general activando una molécula de agua promoviendo la hidrólisis del intermediario cisteinil-fosfato<sup>139</sup>.

Existe una subdivisión en esta familia de fosfatasas: las PTP clásicas y fosfatasas de especificidad dual (DSP). Las PTP clásicas defosforilan exclusivamente residuos de tirosina; mientras que, las fosfatasas DSP defosforilan residuos de tirosina y de serina/treonina.

Las PTP clásicas pueden ser fosfatasas transmembranales o no. Los miembros de este grupo son PTP1B (el miembro prototipo), TCPTP, MEG 1-2, PEST, LyPTP, PTPH1, PTPD1-2, PTPBAS, CD45, PTP $\alpha$ , PTP $\beta$ , PTP $\delta$ , PTP $\epsilon$ , PTP $\gamma$ , PTP $\kappa$ , PTP $\lambda$ , PTP $\mu$ , PTP $\rho$ , PTP $\sigma$ , PTP $\zeta$ , LAR, DEP1, SAP1, GLEPP1 y SHP1-2. Estas proteínas pueden presentar uno o dos dominios de fosfatasa. Los dominios de fosfatasa están formados por 240-250 residuos de aminoácidos que contienen la secuencia HCSAGXGRXG. La estructura del sitio activo de las PTP clásicas, en particular la profundidad del sitio catalítico, le confiere su especificidad por residuos de tirosina. Los dominios asociados al dominio catalítico regulan la actividad de la enzima, directa o indirectamente, pues le proveen la forma de interactuar con su sustrato o con proteínas reguladoras<sup>139</sup>.

Las PTP expresadas en mamíferos que contienen dominios SH2 (SHP), SHP1 y SHP2, presentan la misma topología. Los dos dominios SH2 se localizan hacia la

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

porción N-terminal. Presentan un dominio de fosfatasa y dos sitios de fosforilación en residuos de tirosina hacia la porción C-terminal. En SHP2 estos sitios de fosforilación están flanqueados por dominios ricos en residuos de prolina. Los dominios SH2 de las SHP regulan su actividad permitiéndole asociarse a proteínas fosforiladas en residuos de tirosina o bien regulando la actividad catalítica directamente. El dominio SH2 N-terminal, en ausencia de un ligando apropiado, se une al dominio de fosfatasa inactivándolo. En presencia del ligando esta interacción se interrumpe y la enzima se activa. Esto evita que las fosfatasas SHP sean activadas si no se localizan en un sitio específico; a través de este mecanismo se regula su especificidad<sup>139</sup>.

Después de la agregación de los Fc $\gamma$ R la fosfatasa SHP1 se asocia a los residuos fosforilados del ITIM y con ello regula negativamente la vía<sup>138</sup>. En ratones Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> se observó que la vía de señalización inducida con la agregación de este receptor regula negativamente la fagocitosis mediada por los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIII<sup>138</sup>. La sobreexpresión de SHP-1, en macrófagos murinos de la línea celular J774, evita la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R<sup>138</sup>. Se propuso que SHP-1 regula negativamente la vía asociándose con la proteína adaptadora Cbl y defosforilándola. Al defosforilarla se evita que Cbl continúe la señal de activación; la cual al perecer, activa a PI-3K<sup>138</sup>.

La proteína Cbl (de las siglas en inglés de Casitas B-lineage lymphoma) de aproximadamente 120 kDa pertenece a una familia de proteínas adaptadoras<sup>140</sup>. Esta familia contiene a Cbl y a dos proteínas muy relacionadas: Cbl-b y Cbl-c. Las proteínas Cbl y Cbl-b presentan los mismos dominios y mantienen un alto grado de identidad en su secuencia, particularmente en la mitad N-terminal (84% de identidad). Ambas,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

presentan una región que les permite unirse a residuos de tirosina fosforilados presentes en cinasas de residuos de tirosina activadas. Esta región esta formada por tres módulos que involucran a cuatro hélices compactas, un dominio EF de unión a  $Ca^{2+}$  y una variante del dominio SH2. Esta región ha sido nombrada como dominio de unión a residuos de tirosina de cinasa, dominio TKB (de las siglas en inglés de tyrosine-kinase-binding). Además del dominio TKB estas proteínas presentan un dominio de dedos de zinc coordinados; este dominio le permite interactuar con la proteína E2s, que participa en los mecanismos de degradación de proteínas dependientes de ubiquitinación. La proteína Cbl (a diferencia de Cbl-b) presenta una región rica en residuos de prolinas, que le permite interactuar con proteínas que contengan dominios SH3 y una región C-terminal de cierre de leucinas, que le permite unirse a proteínas ubiquitinadas. Cbl y Cbl-c se expresan en todos los tipos celulares de mamíferos, pero los niveles de expresión de Cbl son mayores en timo <sup>140</sup>.

Cbl está involucrada en eventos de señalización en donde participa como una proteína adaptadora multidominio. Algunas de las interacciones entre Cbl y otras proteínas ocurren en respuesta a la estimulación celular a través de distintos receptores. A través de las interacciones que puede establecer Cbl, es reclutada junto con otras proteínas a los sitios en donde se activaron a los receptores. Cbl puede interaccionar a través del dominio TKB con el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), con el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), y con las cinasas de la familia Syk/ZAP-70. Esta interacción puede regular negativamente la actividad de estas enzimas; pues a través de Cbl, ellas interaccionan con enzimas que ubiquitinan proteínas (E2s). Con la ubiquitinación de estas enzimas se dirige su degradación a través del proteosoma o del lisosoma. En consecuencia, se

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

apaga la señal y se genera un período refractario en la respuesta pues ahora será necesario sintetizarlas de *novo*<sup>140</sup>.

Cbl es sustrato para cinasas de residuos de tirosina y cinasas de residuos de serina. Estos sitios de fosforilación promueven su asociación con la proteína 14-3-3, Vav, CrkL y PI-3K; a través los dominios SH2 presentes en estas proteínas. Algunas asociaciones pueden ser constitutivas, como las que se dan a través de la región rica en prolina con el dominio SH3 de Grb2<sup>140</sup>.

Cbl participa en la fagocitosis mediada por Fc $\gamma$ R y en la señalización inducida por la agregación del TCR y BCR. Cuando estos receptores son agregados Cbl es fosforilado en tirosina. La fosforilación es resultado de la asociación de Cbl con cinasas de residuos de tirosina de la familia Syk. A estos sitios se puede asociar la subunidad reguladora, p85, de cinasa PI-3K; y con ello incrementa su actividad la subunidad catalítica, p110, y eventualmente la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R en monocitos humanos de la línea celular U937. Lyn también se asocia a Cbl en respuesta a la agregación de los Fc $\gamma$ R. Sin embargo, su actividad no se incrementa; como si ocurre en el caso de Syk<sup>141</sup>.

Aún no se sabe con exactitud cómo Cbl regula los eventos iniciados con la activación de las cinasas las familias Src y Syk. Pero se sabe que Cbl es fosforilada en residuos de serina/treonina cuando las células son estimuladas a través de los Fc $\gamma$ R; y que cuando linfocitos T y neutrófilos son tratados con esteres de forbol, se observa un incremento en la fosforilación en residuos de serina/treonina de Cbl<sup>142</sup>. Esto sugiere la participación de isoformas de PKC sensibles a DAG en la cascada de señalización; y aunque se ha demostrado que Cbl es sustrato de PKC en ensayos de actividad de

cinasa in vitro, Cbl no se asocia firmemente con PKC. Tal vez, otra molécula participa en este proceso.

## DIFERENCIAS EN LAS REPUESTAS FAGOCÍTICAS INDUCIDAS POR DISTINTOS ESTÍMULOS.

Como resultado del trabajo de nuestro laboratorio se obtuvieron anticuerpos monoclonales de distintas subclases de IgG, específicos para el 2,4-dinitrofenol (anticuerpos anti-DNP). Las distintas subclases de anticuerpos (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) median con distinta eficiencia la fagocitosis de eritrocitos opsonizados<sup>143</sup>. La capacidad de anticuerpos de la subclase IgG1 para mediar fagocitosis es tres veces menor que la de anticuerpos de la subclase IgG2b. Esto podría explicarse si las distintas subclases de IgG unieran con distinta afinidad al antígeno. Pero al probar si esta hipótesis era cierta, se determinó que la constante de afinidad de los anticuerpos de ambas subclases para la unión del hapteno era muy similar ( $K_a \cong 4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ); y tampoco se observaron diferencias en la capacidad para opsonizar a la partícula<sup>143-144</sup>.

Otra posible explicación sería que cada subclase mediara con distinta eficiencia la interacción entre la partícula opsonizada y el fagocito. Para probar esta hipótesis se determinó la formación de rosetas, donde se determina la interacción entre el eritrocito opsonizado (Ig) y la célula fagocítica (receptor de Ig) y no se observaron diferencias, significativas estadísticamente, en la formación de rosetas entre los distintos anticuerpos. Estas diferencias se observaron aún cuando se probaron mas de un anticuerpo de cada subclase y los ensayos se realizaron en varias líneas murinas<sup>143</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las diferencias entre estos dos anticuerpos para inducir fagocitosis no pueden explicarse basándose en las diferencias de unión entre la inmunoglobulina y el receptor, o entre la inmunoglobulina y el hapteno. Tal vez los agregados IgG-receptores que forman estas inmunoglobulinas tienen diferencias estructurales, las cuales pueden traducirse en diferencias cualitativas y cuantitativas en la activación de distintas enzimas, generando las diferencias observadas en la fagocitosis. Para analizar esta hipótesis se determinó el efecto de distintos inhibidores enzimáticos sobre enzimas involucradas en la fagocitosis y se observó que existían diferencias en la participación de distintas enzimas en cada caso. Los dos estímulos fagocíticos dependen de la misma manera de la actividad de las enzimas PLD/PLA<sub>2</sub> y MAPK. Sin embargo, la participación de la vía de MAPK es más trascendente para que se lleve a cabo la fagocitosis que la participación de la vía de PLD/PLA<sub>2</sub>. Las principales diferencias se observaron en la participación de PI 3-K y PKC. La fagocitosis de partículas opsonizadas con anticuerpos de la subclase IgG2b, depende en gran medida de la actividad de PI 3-K, pero esta dependencia es menor para la fagocitosis de partículas opsonizadas con anticuerpos de la subclase IgG1. Y el mismo fenómeno se observa por la dependencia de la actividad de PKC, pero la diferencia es más drástica<sup>145</sup>.

Cuando las células son tratadas con el inhibidor Ro 31-8220, que inhibe la actividad de las cinasas de la familia PKC, se inhibe tanto la fagocitosis mediada por la subclase IgG1 como la mediada por la subclase IgG2b. Esto concuerda con datos publicados donde se reporta que la fagocitosis mediada por los FcγR requiere de la actividad de las cinasas de la familia PKC. Sin embargo, cuando las células son

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

tratadas con el inhibidor GF109203X, que inhibe a concentraciones distintas a las isoformas clásicas y a las isoformas nuevas de las cinasas de la familia PKC, la fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG1 no disminuye a las concentraciones que afectan a las isoformas clásicas; mientras que la fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG2b es abatida<sup>145</sup>. Esto sugiere que la diferente eficiencia para fagocitar partículas opsonizadas con anticuerpos de la subclase IgG1 o con anticuerpos de la subclase IgG2b se deben a diferencias en su capacidad para estimular las vías de activación celular. Este trabajo se enfoca a analizar esta hipótesis.

TESIS COM  
FALLA DE ORIGEN

## JUSTIFICACIÓN

Por los antecedentes del trabajo, se sabe que anticuerpos de las subclases IgG1 e IgG2b tienen la misma capacidad para opsonizar y que éstas partículas interactúan en un número igual con la célula fagocítica; sin embargo, las partículas opsonizadas con cada subclase no son fagocitadas con la misma eficiencia. Estos eventos presentan distinta susceptibilidad a inhibidores específicos para cinasas de las familias PKC y PI-3K. Esto nos sugiere que las diferencias observadas en la fagocitosis que inducen ambas subclases se deben a diferencias en su capacidad para estimular las vías de activación celular mediadas por los Fc $\gamma$ R. Sin embargo, aún no se logra comprender cómo es que se activan y regulan estas señales.

Estos receptores no han sido tan estudiados como otros MIRRs debido a la complejidad del sistema. Debemos considerar que una sola célula puede expresar al mismo tiempo varios tipos de receptores Fc $\gamma$ R. Si eso no es suficiente, cada receptor reconoce con distinta afinidad al mismo ligando (agregados de IgG o partículas opsonizadas con IgG) y los mecanismos de transducción de señales involucran, en la mayoría de los casos, a los mismos mediadores. Esto dificulta el análisis de las vías de activación inducidas por cada isoforma, en sistemas que no sean manipulados genéticamente. Si bien se reconoce desde hace muchos años que la agregación es el evento necesario y suficiente para iniciar las cascadas intracelulares, no es clara la manera en cómo el sistema puede generar distintas respuestas y si estas diferencias están asociadas al tamaño del agregado, su conformación, o si están formados por distintas subclases de IgG.

Es posible imaginar que las distintas subclases formen agregados de complejos IgG-Fc $\gamma$ R con distintas propiedades biofísicas: movilidad, flexibilidad, rigidez, conformación del agregado; que a su vez resulten en cambios en su eficiencia para mediar la señal.

Como las respuestas mediadas por los Fc $\gamma$ R están involucradas en mantener el estado de homeostasis en el organismo y participan en procesos involucrados tanto en la respuesta innata, como en la respuesta inmune adaptativa, es importante determinar los mecanismos moleculares de activación inducida a través de estos receptores y así entender mejor la función del receptor y las posibles vías de regulación celular.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## HIPÓTESIS

La diferente eficiencia entre la fagocitosis de partículas opsonizadas con anticuerpos de la subclase IgG1 (2C5) y de la subclase IgG2b (4F8) se deben a diferencias en su capacidad para estimular las vías de activación celular.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Examinar comparativamente la participación de distintas enzimas en las vías de señalización inducidas por la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con un anticuerpo monoclonal de la subclase IgG1 (2C5) y con uno de la subclase IgG2b (4F8).

### Objetivos particulares

- \* Determinar si existen diferencias en la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con ambas subclases en células tratadas con PMA.
- \* Definir el estado de fosforilación de la proteína Syk en células estimuladas con eritrocitos opsonizados con ambas subclases.
- \* Determinar si el estado de fosforilación se relaciona con el estado de activación de Syk en células estimuladas con eritrocitos opsonizados con ambas subclases.
- \* Determinar el papel de fosfatasas sobre la fagocitosis inducida por eritrocitos opsonizados con ambas subclases, usando el inhibidor pervanadato.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- \* Definir si existe una asociación directa entre la cinasa Syk y la fosfatasa SHP en respuesta a la estimulación con eritrocitos opsonizados con ambas subclases.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## MATERIALES Y METODOS

**Cultivo celular.** Células (macrófagos) de la línea celular J774 se cultivaron en medio D-MEM (Gibco BRL, Grand Island, NY), en una atmósfera húmeda con 6% de CO<sub>2</sub> a 37°C. El medio D-MEM se preparó según las instrucciones del fabricante<sup>146</sup>. Para 1 litro de medio se disuelve el contenido de un sobre de medio en polvo en un litro de agua desionizada, agregando 3.7 gramos de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>). Se ajusta el pH a 7.1, se esteriliza por filtración y se guarda a temperatura ambiente y cubierto de la luz. Este medio se adicionó con distintos componentes según los requerimientos:

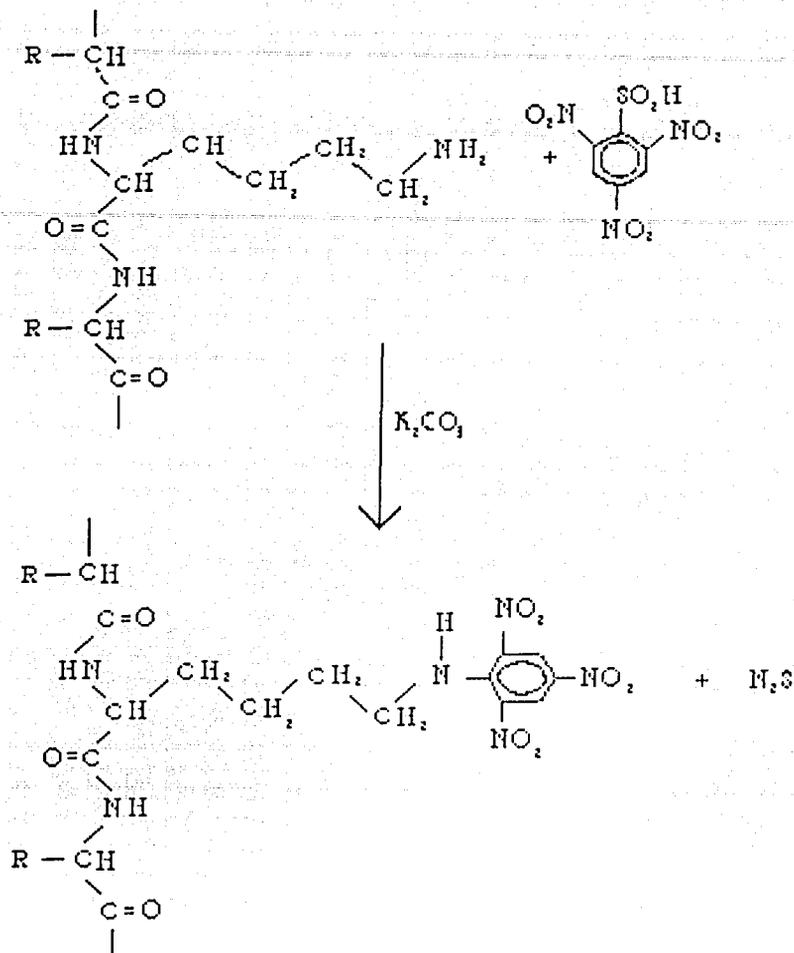
- Medio de cultivo D-MEM semicomplementado: el medio D-MEM estéril se complementó con L-glutamina (concentración final 2 mM), estreptomicina (0.01 mg/ml), penicilina-G (1 000 unidades/ml), aminoácidos no esenciales a una concentración final de 100 nM (Gibco BRL, Grand Island, NY) y piruvato de sodio a una concentración final de 0.1104 mg/ml (Gibco BRL, Grand Island, NY).
- Medio de cultivo D-MEM complementado: al medio de cultivo semicomplementado se le agregó 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island, NY), previamente inactivado por calor a 60°C por 1 h.
- Medio para los ensayos de viabilidad: En D-MEM sin rojo de fenol semicomplementado, se diluyó bromuro de 3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltretazolio (MTT) (Sigma, St. Louis, MO), a una concentración de 5 mg/ml.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Sensibilización de eritrocitos de carnero con trinitrofenol (TNP).** Para estudiar la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R, se utilizó un sistema dinitrofenol (DNP) -antiDNP. Las células fagocitaron eritrocitos de carnero recubiertos de TNP que estaban opsonizados por IgG que reconocen como antígeno al-DNP (el anticuerpo monoclonal 2C5 de la subclase IgG1 y el anticuerpo monoclonal 4F8 de la subclase IgG2b, son anticuerpos anti-DNP y presentan reactividad cruzada para TNP).

Los eritrocitos se sensibilizaron con 2,4,6,-trinitrofenol, TNP (Eastman Kodak CO. Rochester, NY). Para marcar las proteínas de membrana de los eritrocitos con el hapteno TNP, se hacen reaccionar los grupos amino libres de las proteínas con el ácido 2, 4, 6- trinitrobencensulfónico en condiciones ligeramente alcalinas. Después de la reacción se libera un grupo sulfónico quedando el hapteno TNP unido covalentemente a las proteínas de membrana del eritrocito<sup>147</sup> (Fig. 7). El procedimiento es el siguiente:

- Se toman 10 ml de eritrocitos de carnero en solución de Alsevers (100 mM dextrosa, 10 mM NaCl, 27 mM citrato Na 2H<sub>2</sub>O, 40 mM ácido cítrico H<sub>2</sub>O; pH 6-6.2, esterilizar por filtración).
- Se lavan por centrifugación con la solución amortiguadora de dextrosa (DGVB<sup>2+</sup>: 0.05% gelatina, 2.5 mM ácido barbitúrico, 2.5% dextrosa, 75 mM NaCl, 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7.5, esterilizar por filtración), para eliminar los restos de eritrocitos lisados. En cada lavado se centrifuga la suspensión de eritrocitos a 2 200 r.p.m. por 10 min, se elimina el sobrenadante y se resuspende en la solución que se indique.



**Figura 7. Reacción de trinitrofenilación de proteínas.** El ácido 2, 4, 6- trinitrobencensulfónico reacciona con el grupo  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina de la proteína, liberándose ácido sulfónico, y quedando unido a las proteínas el grupo trinitrofenol (TNP). Eisen<sup>147</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Se lava el paquete celular con solución amortiguadora de boratos (200 mM ácido bórico, 150 mM NaCl; pH 8.5) y DGVB<sup>2+</sup> en la misma proporción (V/V), y se elimina el sobrenadante.
- Se adicionan 7 ml de la solución para sensibilizar (6.22 mg TNBS, 7 ml solución amortiguadora de boratos), por cada mililitro de paquete celular.
- La suspensión de eritrocitos se cubre de la luz y se incuba por 10 min a temperatura ambiente en agitación constante.
- Se lava el paquete celular con solución amortiguadora de boratos y se elimina el sobrenadante. Para eliminar completamente el TNBS restante y los eritrocitos lisados se lavan con DGVB<sup>2+</sup>.
- Se mantienen a 4 °C en DGVB<sup>2+</sup>. A esta temperatura se pueden mantener hasta por una semana.

**Titulación de los anticuerpos anti-DNP (Hemaglutinación).** El método de hemaglutinación consiste en hacer diluciones seriadas del anticuerpo en pozos de fondo en V para microtitulación y luego agregar glóbulos rojos sensibilizados para observar la dilución máxima a la cual todavía hay aglutinación. El procedimiento a seguir es el siguiente:

- Se realizan diluciones seriadas (1:4) de los anticuerpos en DGVB<sup>2+</sup> en D-MEM. La concentración inicial de los anticuerpos es de 60 µg/ml.
- Se agrega un volumen igual al de la dilución del anticuerpo, de la suspensión al 1% de eritrocitos sensibilizados, se mezcla cuidadosamente. Al realizar este procedimiento la concentración inicial del anticuerpo será de 30 µg/ml.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Se incuba a temperatura ambiente por 1 h en una cámara húmeda.

La aglutinación de los eritrocitos sensibilizados indica la presencia de una concentración de anticuerpo lo suficientemente alta para permitir la formación de una malla y cuando la concentración es menor se formará un botón en el fondo del pozo. El título de hemaglutinación corresponde a la última dilución en la que aún se forma la malla.

**Opsonización de eritrocitos sensibilizados con TNP.** El procedimiento es el siguiente:

- Se lava los eritrocitos sensibilizados por centrifugación con D-MEM no complementado y se suspenden al 2% en D-MEM.
- Se diluye el anticuerpo en D-MEM no complementado, al doble de la concentración hemaglutinante (usualmente 1.875  $\mu\text{g/ml}$ ).
- Se mezcla la dilución del anticuerpo con los eritrocitos sensibilizados, obteniendo una suspensión al 1 % de eritrocitos y se incuban en agitación constante a temperatura ambiente por 30 min.
- Se lava tres veces con D-MEM no complementado y se resuspenden en la misma solución obteniendo una suspensión al 1 % de eritrocitos opsonizados.

**Fagocitosis por la técnica de Diaminobencidina.** En el laboratorio se estandarizó una técnica colorimétrica para cuantificar la fagocitosis, basada en el método de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Jungi<sup>148</sup>. Esta técnica se basa en la actividad de pseudoperoxidasa que posee la hemoglobina, la cual desarrolla un compuesto colorido en presencia de 3,3-diaminobencidina, DAB (Sigma, St. Louis, MO) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Merck, Darmstadt, Alemania). Esta reacción colorida puede ser cuantificada espectrofotométricamente. El procedimiento a seguir es el siguiente:

- Se siembran  $4 \times 10^4$  células J774 por pozo en una placa de cultivo de 96 pozos en D-MEM complementado y se incuban en atmósfera húmeda con 6% de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24 h. Pasado este tiempo las células se duplican de manera que a las 24 h hay aproximadamente  $8 \times 10^4$  células por pozo.
- Las monocapas de células se lavan 2 veces con medio semicomplementado y se agregan 100 µl de medio complementado.
- Por cada pozo se agregan 30 µl de la suspensión al 1% de eritrocitos opsonizados (como ya se describió) y se incuban durante 50 min a 37°C con 6 % de CO<sub>2</sub>.
- Para eliminar los eritrocitos que no fueron internalizados, pasado el tiempo de incubación, las células se lavan con agua destilada por 20 seg en agitación suave. Después se realizan tres lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS: 2.6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 7.74 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro, 0.16 mM NaCl; pH 7.5).
- Las células J774 se lisan con 100 µl/pozo del detergente SDS (Bio-Rad, Richmond, CA) al 0.3% en PBS.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Las placas se incuban a temperatura ambiente en agitación constante por 30 min. Pasado ese tiempo se adicionan 200  $\mu$ l/pozo del sustrato DAB (1.5 mg de DAB, 15  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 5 ml de PBS).
- Las placas se incuban a temperatura ambiente en agitación constante por 1 min.
- Se determina la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro (modelo 3530 Bio-Rad Microplate Reader; BIO-RAD Richmond, CA)

En los experimentos individuales, cada condición experimental se realizó por triplicado y los datos de cada experimento se expresan como la media +/- la desviación estándar.

**Tratamientos con pervanadato y forbol 13-miristato 12-acetato (PMA).** Las células se sembraron siguiendo el protocolo de fagocitosis y se lavaron en la misma forma, pero se mantuvieron en medio semicomplementado, para la incubación con cada compuesto. Al final del tiempo de incubación se continuó con el protocolo de fagocitosis o bien de viabilidad por el método de MTT (ver mas adelante).

Los intervalos de concentraciones y los tiempos de incubación usados para cada compuesto se propusieron a partir de datos reportados por otros grupos de trabajo. Las diluciones de cada compuesto se realizaron en medio semicomplementado; cada compuesto se incubó con las células en una atmósfera húmeda con 6% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Después de la incubación se determinó la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con la

concentración hemaglutinante de los anticuerpos 2C5 y 4F8. Las concentraciones que se usaron para cada compuesto y el tiempo de incubación, fueron los siguientes:

- Para el éster de forbol, miristato acetato (PMA) (Calbiochem-Novabiochem CO. La Jolla, CA), se probaron las concentraciones 10, 25, 50, 150 y 500 nM, luego de adicionar el PMA se continuo inmediatamente con el protocolo de fagocitosis.
- Para el pervanadato se probaron las concentraciones 10, 50 y 100  $\mu$ M. Las células se incubaron con el pervanadato por 5 min. Pasado ese tiempo se decantó el medio y las células se resuspendieron en medio semicomplementado para continuar el protocolo de fagocitosis  
Para obtener el pervanadato se mezcla 1 ml de ortovanadato de sodio,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (New England Biolabs, Inc. Beverly, MA), con 330  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (New England Biolabs, Inc. Beverly, MA) y se incuba por 5 min a temperatura ambiente<sup>149</sup>. Con este procedimiento se obtiene una solución 6 mM de pervanadato.

**Ensayo de viabilidad por el método de bromuro de 3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltretazolío (MTT).** Después de tratar a las células con cada uno de los inhibidores por los tiempos de incubación indicados, se determinó la viabilidad. Para determinar la viabilidad celular se utilizo la técnica descrita por Mosmann en 1983<sup>152</sup>. Esta técnica se basa en la capacidad de las enzimas mitocondriales de células viables para transformar el bromuro de 3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltretazolío, MTT; en un compuesto colorido. La cantidad de MTT reducido es proporcional al número de células

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

viabiles<sup>150-151</sup>. El producto colorido puede medirse espectrofotométricamente. La técnica original ha sufrido algunas modificaciones con el objeto de solubilizar las sales de MTT reducido<sup>150,153</sup>. En nuestro trabajo el procedimiento empleado fue el siguiente:

- Después de la incubación por el tiempo indicado para cada inhibidor, el medio se retiró y las células se lavaron dos veces con medio semicomplementado.
- Se agregaron alícuotas de 50  $\mu$ l por pozo del medio para ensayos de viabilidad y se incubaron por 2 horas en una atmósfera húmeda con 6% de CO<sub>2</sub> a 37°C.
- Se retiró el medio por aspiración.
- Se dejó evaporar a temperatura ambiente por 30 min, en una campana de extracción de gases (los gases de MTT son tóxicos).
- Se agregaron 100  $\mu$ l por pozo de la solución de extracción (20% SDS, 50% dimetilformamida; pH 7.4 agregando solución 80% ácido acético, 1N HCl)
- Se selló la placa y se incubó toda la noche a 37°C en una cámara húmeda
- Se determinó la absorbancia a 570 nm en un lector de ELISA (modelo 3530 Bio-Rad Microplate Reader: BIO-RAD Richmond, CA).

**Estimulación de los Fc $\gamma$ R con eritrocitos opsonizados con IgG.** Después de mantener a las células por 2 h en medio semicomplementado en una atmósfera húmeda con 6% de CO<sub>2</sub> a 37°C, se estimulan las células utilizando eritrocitos opsonizados. En nuestro trabajo el procedimiento empleado fue el siguiente:

- Para cada condición experimental se utilizaron  $1 \times 10^7$  células.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Se despegaron por pipeteo a las células de cajas petri de cultivo en suspensión (cat. 430591, Corning Incorporated, Corning, NY) y se incubaron en medio semicomplementado por 10 min a 4°C.
- Se recuperan las células, tomando el sobrenadante y centrifugando a 1200 r.p.m. por 3 min a 4°C; y se incuba con una suspensión fría (4°C) de eritrocitos sensibilizados u opsonizados (relación de 15 µl de suspensión al 4% por cada  $1 \times 10^5$  células), por 15 min en agitación constante a 4°C.
- Se elimina el exceso de eritrocitos lavando por centrifugación (12 seg a 7 000 r.p.m.) con PBS frío (4°C) que contiene 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM NaF, 2 mM PMSF, 2 mM EDTA, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml pepstatina y 10 µg/ml leupeptina.
- Las células se resuspenden en medio semicomplementado y se incuban a 37°C, en agitación suave.
- A distintos tiempos de estimulación se detiene la estimulación agregando una solución hemolizante a 4°C.
- Se recupera la pastilla celular y se lisan para procesar el contenido celular.

**Lisis celular e inmunoprecipitación.** Después de estimular a las células J774 utilizando eritrocitos sensibilizados u opsonizados, se lisan y se recupera la fracción soluble en detergente. Esta fracción se analiza en su totalidad para determinar el patrón de fosforilación general tras la activación celular o bien se usa para inmunoprecipitar enzimas específicas. El procedimiento empleado es el siguiente:

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Tras ser estimuladas las células se lisan en solución amortiguadora Tris (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA; pH 7.5), que contiene 1% de Tritón X-100, 0.1% de SDS, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM NaF, 2 mM PMSF, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de aprotinina, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pepstatina y 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptina.
- El lisado celular se incuba por 15 min a 4°C. Pasado ese tiempo se centrifuga a 13 000 r.p.m. por 5 min a 4°C.
- Se recupera el sobrenadante (la fracción soluble en detergente) y se determina la concentración de proteína usando el ensayo comercial para determinación de proteína (cat 500-0116 Bio-Rad. Richmond, CA). A partir de esta fracción se pueden analizar las características generales en lisados totales o bien las características de una proteína en particular en inmunoprecipitados.
- **Lisados totales:** se toman 100  $\mu\text{g}$  de proteína del sobrenadante. Se complementan con 20  $\mu\text{l}$  de solución 8X-Laemmli reductora y se hierven por 5 min; para ser analizados por inmunoblot (ver mas adelante).
- **Inmunoprecipitados:** se recupera el sobrenadante de la lisis de  $1 \times 10^7$  células y se incuba con 2  $\mu\text{g}$  de anticuerpo anti-Syk N19 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), durante toda la noche a 4°C, en agitación constante.
- Se inmunoprecipita incubando el sobrenadante con 40  $\mu\text{l}$  de perlas de proteína A-agarosa (Bio-Rad, Richmond, CA) por 2 h a 4°C en agitación constante.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Se recupera el inmunoprecipitado centrifugando las muestras por 1 min a 7 000 r.p.m. y se retira el sobrenadante.
- El inmunoprecipitado se lava tres veces con una solución amortiguadora de Tris (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA; pH 7.5), que contiene 0.1% de Tritón X-100, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM NaF, 2 mM PMSF, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml pepstatina y 10 µg/ml leupeptina. Se elimina el sobrenadante y se agregan 40 µl de solución 4X-Laemmli reductora. Se hierven por 5 min los inmunoprecipitados; para ser analizados por inmunoblot (ver mas adelante).

#### **Análisis por inmunoblot.**

- Los lisados totales o los inmunoprecipitados se someten a electroforesis en geles de acrilamida al 10%<sup>154</sup> y se transfieren a membranas de nitrocelulosa<sup>155</sup>.
- La membrana de nitrocelulosa se bloquea toda la noche a 4°C. Para ello se usa una solución de TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl; pH 7.5) que contiene 0.05% del detergente Tween 20, 3% de leche en polvo sin grasa (Carnation, Nestlé) y 1% de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma, St. Louis, MO). Tras el bloqueo se elimina el exceso de proteína lavando tres veces la membrana de nitrocelulosa con TBS que contenga 0.05% de Tween 20 (TBS-0.05% tween).
- La membrana de nitrocelulosa se incuba por 1.5 h con una dilución 1:1000 del anticuerpo primario en TBS-0.05% Tween, 3% leche y 1% BSA, en

- agitación constate a temperatura ambiente. Los siguientes anticuerpos se usaron como anticuerpos primarios: el anticuerpo monoclonal anti-PY (generado en ratón); los anticuerpos policlonales anti-Syk N19 y anti-PTP (generados en conejo)(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).
- Se lava la membrana con TBS-0.05% Tween. Cuatro cambios de 5 min cada uno.
  - La membrana de nitrocelulosa se incuba por 30 min con una dilución 1:5000 del anticuerpo secundario en TBS-0.05% Tween, 3% leche y 1% BSA, en agitación constate a temperatura ambiente. Los siguientes anticuerpos (acoplados a HRP, de sus siglas en inglés HorseRadish Peroxidase) se usaron como anticuerpos secundarios: el anticuerpo anti-ratón (generado en conejo) o el anticuerpo anti-conejo (generados en cabra)(Zymed; San Francisco, CA), según convenga.
  - Se lava la membrana con TBS-0.05% Tween. Cuatro cambios de 5 min cada uno.
  - Se visualizan las bandas inmunoreactivas usando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal (Pierce, Rockford, IL).
  - Las imágenes quimioluminiscentes se capturan utilizando el aparato Gel-Doc 2000 (Bio-Rad, Hercules, CA) y se analizaron con el software QuantityOne (Bio-Rad, Hercules, CA).
  - Si se desea probar otro anticuerpo primario, se eliminan los anticuerpos unidos a la membrana tratándola con una solución "stripping" de glicina/SDS (100 mM Glicina, 0.5% SDS; 2.5 pH) a 70°C por 1 h. Se lava la membrana

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

con TBS-0.05% tween. Cuatro cambios de 5 min cada uno y se continúa el protocolo de inmunoblot.

**Ensayo de actividad de cinasa *in vitro*.** Después de estimular a las células J774 utilizando eritrocitos sensibilizados u opsonizados, se lisan y se recupera la fracción soluble en detergente. Esta fracción se usa para inmunoprecipitar la cinasa Syk y determinar la actividad de la enzima analizando su capacidad para fijar [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP a proteínas. El procedimiento empleado es el siguiente:

- Se estimulan  $1 \times 10^7$  de células siguiendo el protocolo de estimulación de los Fc $\gamma$ R con eritrocitos opsonizados con IgG.
- Se lisan en una solución amortiguadora Tris (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl; pH 7.5), que contiene 1% del detergente Brij 96, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA, 10 mM NaF, 2 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml de aprotinina, 10  $\mu$ g/ml pepstatina y 10  $\mu$ g/ml leupeptina.
- El lisado celular se incuba por 15 min a 4°C. Pasado ese tiempo se centrifuga a 13 000 r.p.m. por 5 min a 4°C.
- Se recupera el sobrenadante y se incuba con 2  $\mu$ g de anticuerpo anti-Syk N19 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), durante toda la noche a 4°C, en agitación constante.
- Se inmunoprecipita incubando el sobrenadante con 40  $\mu$ l de perlas de proteína A-agarosa por 2 h a 4°C en agitación constante.
- Se recupera el inmunoprecipitado centrifugando las muestras por 1 min a 7 000 r.p.m. y se retira el sobrenadante.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Se lava una vez con una solución amortiguadora de Hepes (25 mM Hepes, 150 mM NaCl; pH 7.5), que contiene 0.1% de Brij 96, 100  $\mu$ M  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM NaF, 2 mM PMSF y 10  $\mu$ g/ml de aprotinina.
- Se lava dos veces con una solución amortiguadora de Hepes sin detergente y que contiene 100  $\mu$ M  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM NaF, 2 mM PMSF y 10  $\mu$ g/ml de aprotinina.
- Al inmunoprecipitado se agregan 500  $\mu$ l de solución amortiguadora de reacción de cinasa (25 mM Hepes, pH 7.5; 10 mM  $\text{MnCl}_2$ ), que contiene 100  $\mu$ M  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM NaF, 2 mM PMSF y 10  $\mu$ g/ml de aprotinina. Se incuba por 5 min a 4°C.
- Se recupera el inmunoprecipitado centrifugando las muestras por 1 min a 7 000 r.p.m. y se retira el sobrenadante. Se agregan 20  $\mu$ l de solución amortiguadora de reacción de cinasa que contienen 5  $\mu$ Ci [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP con o sin sustrato exógeno. Si se agrega sustrato exógeno se adiciona a los 20  $\mu$ l que contienen 5  $\mu$ Ci [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, 1  $\mu$ g/ml de la proteína básica de mielina (PBM).
- Se incuba por 10 min a 37°C. Pasado ese tiempo se transfieren las muestras a hielo.
- Si el ensayo se realiza en presencia de PBM, se agregan 20  $\mu$ l de solución 8X-Laemmli reductora. Se hierven por 5 min y se someten a electroforesis para después transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa.
- Si el ensayo no se realiza en presencia de PBM, se agregan 500  $\mu$ l de solución amortiguadora de reacción de cinasa fría (4°C).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Se recupera el inmunoprecipitado y se lava seis veces con solución amortiguadora de reacción de cinasa fría.
- Se elimina el sobrenadante y se agregan 30  $\mu$ l de solución 8X-Laemmli reductora. Se hierven por 5 min y se someten a electroforesis para después transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa.
- En ambos casos la membrana se expone y se revela por autoradiografía.
- Después de revelar se analiza por inmunoblot la cantidad de proteína Syk cargada por carril. Se visualizan las bandas inmunoreactivas usando el substrato quimioluminiscente SuperSignal (Pierce, Rockford, IL).
- Las imágenes luminiscentes se capturan utilizando el aparato Gel-Doc 2000 (Bio-Rad, Hercules, CA) y se analizaron con el software QuantityOne (Bio-Rad, Hercules, CA).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESULTADOS

La activación de PKC incrementa la fagocitosis mediada por el anticuerpo de la subclase IgG1 (2C5) hasta asemejar la fagocitosis mediada por el anticuerpo de la subclase IgG2b (4F8) en condiciones normales. Datos previos mostraron que anticuerpos monoclonales anti-DNP de la subclase IgG2b eran más eficientes que anticuerpos de la subclase IgG1 para mediar fagocitosis<sup>143</sup>. Una explicación simple de esta observación es que existan diferencias en la afinidad por el hapteno entre cada subclase; estas diferencias se traducirían en una capacidad distinta para opsonizar a la partícula que, en consecuencia, no interaccionarían de la misma manera con la célula fagocítica. Cuando se probó esta hipótesis experimentalmente no se observaron diferencias en afinidad que explicaran la contrastante capacidad de estos anticuerpos para mediar fagocitosis<sup>144</sup>. Al analizar la vía de señalización inducida por cada subclase, se observó que los dos estímulos fagocíticos dependen de la misma manera de la actividad de las enzimas PLD/PLA<sub>2</sub> y MAPK. Sin embargo, la participación de la vía de MAPK es más trascendente para que se lleve a cabo la fagocitosis que la participación de la vía de PLD/PLA<sub>2</sub><sup>145</sup>.

Se observaron diferencias importantes en el grado de dependencia en la fagocitosis por la actividad de PI 3-K y PKC. La fagocitosis de partículas opsonizadas con un anticuerpo de la subclase IgG2b (4F8), depende de la actividad de PI 3-K, pero esta dependencia es menor para la fagocitosis de partículas opsonizadas con un anticuerpo de la subclase IgG1(2C5). El mismo fenómeno se observa respecto a la dependencia de la actividad de PKC, pero de manera más drástica<sup>145</sup>. Cuando las células son tratadas con el inhibidor Ro 31-8220, que inhibe la actividad de las cinasas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

de la familia PKC<sup>155-160</sup>, se inhibe tanto la fagocitosis mediada por la subclase IgG1, como la mediada por la subclase IgG2b. Esto concuerda con datos publicados donde se reporta que la inhibición farmacológica o la expresión de isoformas dominantes negativas para PKC reduce la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R<sup>161-162</sup>. Sin embargo, cuando las células son tratadas con el inhibidor GF109203X, que inhibe a concentraciones distintas isoformas clásicas e isoformas nuevas de cinasas de la familia PKC<sup>163-166</sup>, la fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG1 no disminuye a las concentraciones que afectan a las isoformas clásicas; mientras que la fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG2b es eliminada<sup>145</sup>. Esto sugiere que la diferente eficiencia para fagocitar partículas opsonizadas con anticuerpos de la subclase IgG1 o con anticuerpos de la subclase IgG2b se deben a diferencias en su capacidad para estimular las vías de activación celular.

Para confirmar el efecto de los inhibidores de PKC y determinar si al estimular exógenamente a las isoformas de PKC sensibles a DAG se observa un incremento en la fagocitosis mediada por la subclase IgG1, realizamos la fagocitosis en presencia de PMA. El PMA se une a un dominio rico en cisteínas que induce la translocación de la cinasa PKC a la membrana<sup>167</sup>. La translocación a la membrana activa a las isoformas dependientes de DAG, sin la necesidad de involucrar a otra enzima.

Las células J774 fueron tratadas con distintas concentraciones de PMA (10, 25, 50, 150 y 500 nM), o bien solo con el vehículo DMSO durante el tiempo que se realizaba la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con anticuerpos de ambas subclases a la concentración hemaglutinante (1.875  $\mu$ g/ml) o bien solo con eritrocitos sensibilizados. La fagocitosis mediada por anticuerpos de ambas subclases se

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

incrementa cuando las células son tratadas con PMA, pero no así la fagocitosis de eritrocitos sensibilizados (Fig. 8). La fagocitosis se incrementa de manera proporcional al aumento en la concentración de PMA, entre las concentraciones de 10 y 100 nM; por arriba de esta concentración el incremento es mínimo. Para comparar los valores de fagocitosis de eritrocitos opsonizados con cada subclase en células tratadas con PMA y no tratadas, las células J774 se trataron con la concentración de PMA a la cual se observa el 50% de activación, 50 nM, o bien solo con el vehículo, DMSO, durante el tiempo que se realizaba la fagocitosis de eritrocitos opsonizados o bien solo con eritrocitos sensibilizados. Las concentraciones de anticuerpos empleadas para cada subclase fueron de 30, 7.5, 1.875, 0.47, 0.12, 0.03 y 0.007  $\mu\text{g/ml}$ . Se observa que el aumento en la fagocitosis mediada por la subclase IgG1 es mayor que el aumento en la fagocitosis mediada por la subclase IgG2b. El incremento en la fagocitosis mediada por la subclase IgG1 en células tratadas con PMA es tal que casi iguala la fagocitosis mediada por la subclase IgG2b en condiciones normales (Fig. 9).

Para poder afirmar que las células se encontraban en perfecto estado tras ser tratadas con PMA se realizaron ensayos de viabilidad; midiéndose la cantidad de producto colorido formado a partir de la reducción de MTT. Esta técnica permite cuantificar la actividad mitocondrial<sup>150</sup>. El tratamiento con PMA o bien la sola presencia del vehículo (DMSO) no disminuye la actividad mitocondrial y por lo tanto tampoco la viabilidad celular (Fig. 10).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

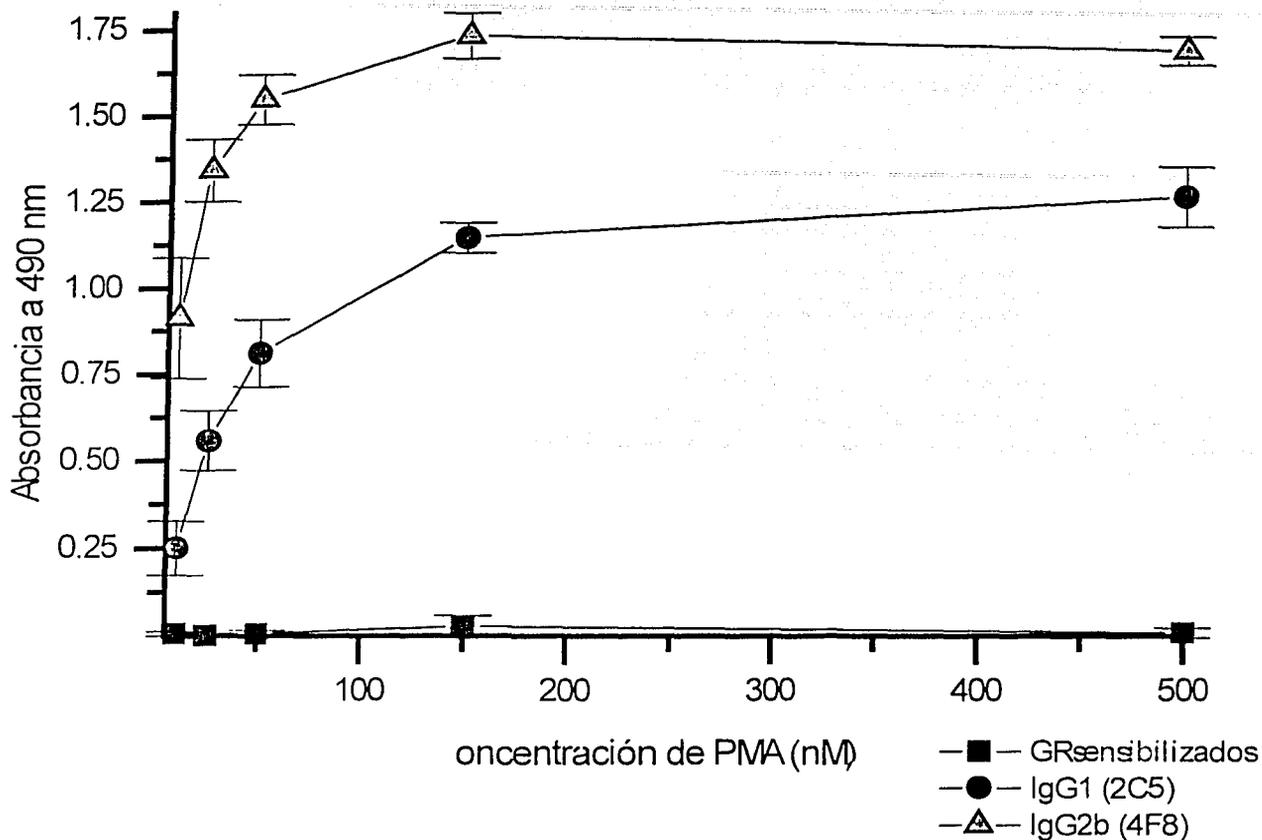
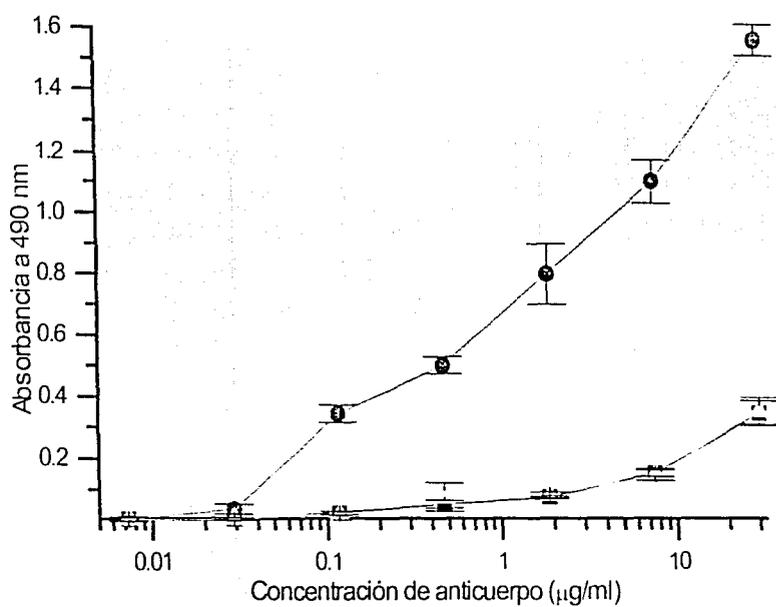
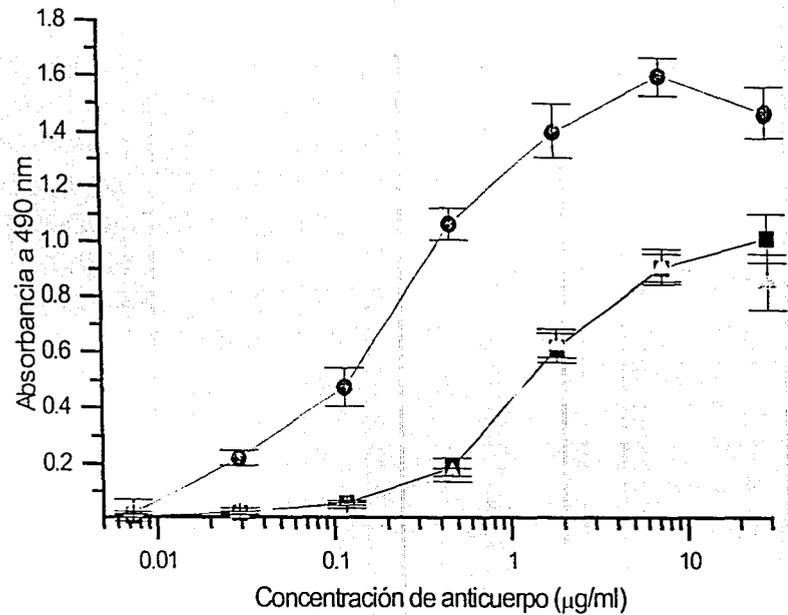


Figura 8. Efecto del PMA sobre la fagocitosis de partículas opsonizadas con anticuerpos de distinta subclase. Macrófagos de la línea celular J774 fueron tratados con concentraciones crecientes de PMA durante el tiempo que transcurría la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con la concentración hemaglutinante (1.875  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) del anticuerpo de la subclase IgG1 (2C5) y del anticuerpo de la subclase IgG2b (4F8). Se muestra el promedio y desviación estándar de 3 experimentos.



■ IgG1 (2C5)  
 ○ IgG1 (2C5) PMA 50 nM  
 □ IgG1 (2C5) DMSO 0.01%

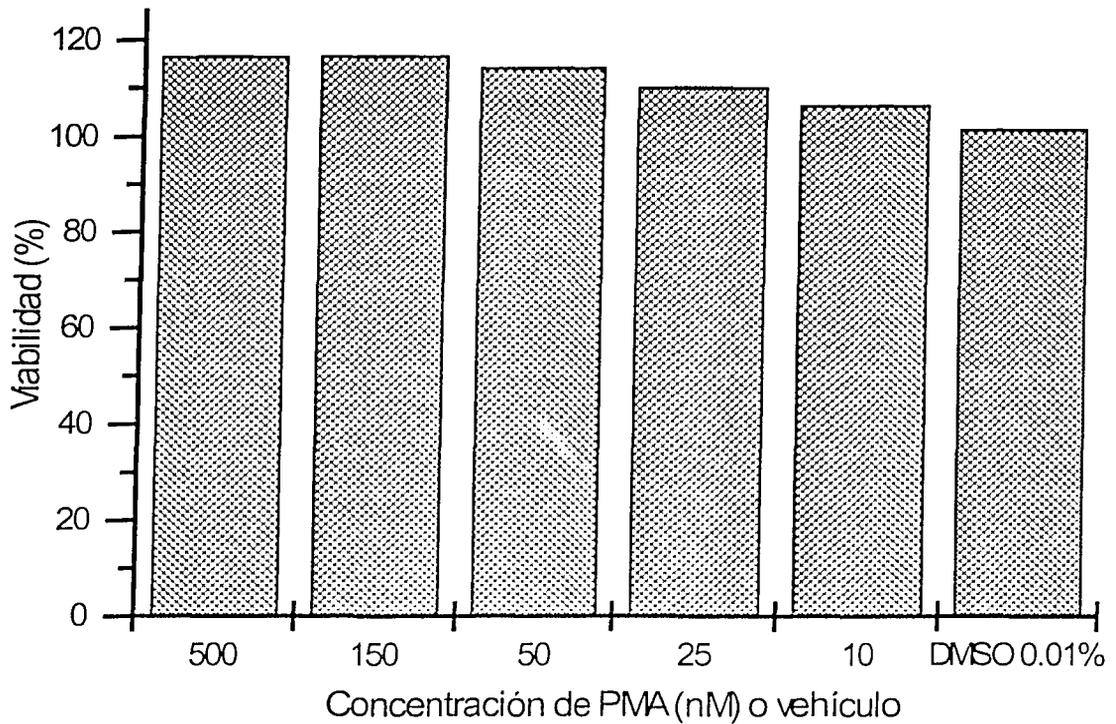


■ IgG2b (4F8)  
 ○ IgG2b (4F8) PMA 50 nM  
 □ IgG2b (4F8) DMSO 0.01%

**Figura 9. Efecto del PMA sobre la fagocitosis de partículas opsonizadas con anticuerpos de distinta subclase.** Macrófagos de la línea celular J774 fueron tratados con 50 nM de PMA durante el ensayo de fagocitosis. Los eritrocitos fueron opsonizados con distintas concentraciones de anticuerpo de la subclase IgG1 (2C5) e IgG2b (4F8). Se muestra el promedio y desviación estándar de 3 experimentos independientes.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

gr



**Figura 10. El tratamiento con PMA o bien con el vehículo (DMSO) no tiene efecto sobre la viabilidad celular.** Las células fueron tratadas con las distintas concentraciones de PMA o la mayor concentración de vehículo, para después determinar por la cantidad de MTT reducido la viabilidad celular. Se muestra el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El grado de fosforilación de la cinasa Syk inducido por la estimulación mediada por la subclase IgG1 no es diferente al inducido por la estimulación mediada por la subclase IgG2b. La cinasa Syk participa en la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R<sup>168-169</sup>. Su activación es un evento muy importante en la fagocitosis, ya que si se inhibe su actividad empleando inhibidores específicos para esta enzima, se bloquea completamente la internalización de la partícula. Esto no ocurre con la fagocitosis mediada por receptores para complemento (CR3). Tampoco ocurre la fagocitosis si se impide la expresión de Syk usando oligonucleótidos antisentido o usando macrófagos de ratones Syk<sup>-/-</sup><sup>73</sup>, lo que no ocurre en el caso de las cinasas de la familia Src, donde es necesario usar triple deficientes para Hck<sup>-/-</sup>, Fgr<sup>-/-</sup> y Lyn<sup>-/-</sup> para observar una disminución en la fagocitosis mas pronunciada, aunque aún así el proceso no se abate completamente. Además, células no hematopoyéticas (que no expresan Syk) son capaces de fagocitar eficientemente si se coexpresa Syk y el receptor apropiado<sup>58,170</sup>. Algunos reportes indican que Syk participa en la formación del esqueleto de actina que se forma bajo la copa fagocítica<sup>171</sup>; y otros que se requiere durante la internalización de la partícula<sup>172</sup>.

Por el papel tan importante de Syk en la activación de los receptores Fc $\gamma$ R, por ser una enzima esencial para que se lleve a cabo la fagocitosis y por que su activación es uno de los primeros eventos en la cascada de señalización, decidimos analizar su estado de fosforilación en respuesta a estímulos fagocíticos. Se sabe que Syk es fosforilada cuando se agregan los receptores Fc $\gamma$ R<sup>169</sup> y que la fosforilación en residuos de las tirosinas Y317, Y342 y Y346 son dependientes de la actividad de la cinasa Lyn<sup>80</sup>.

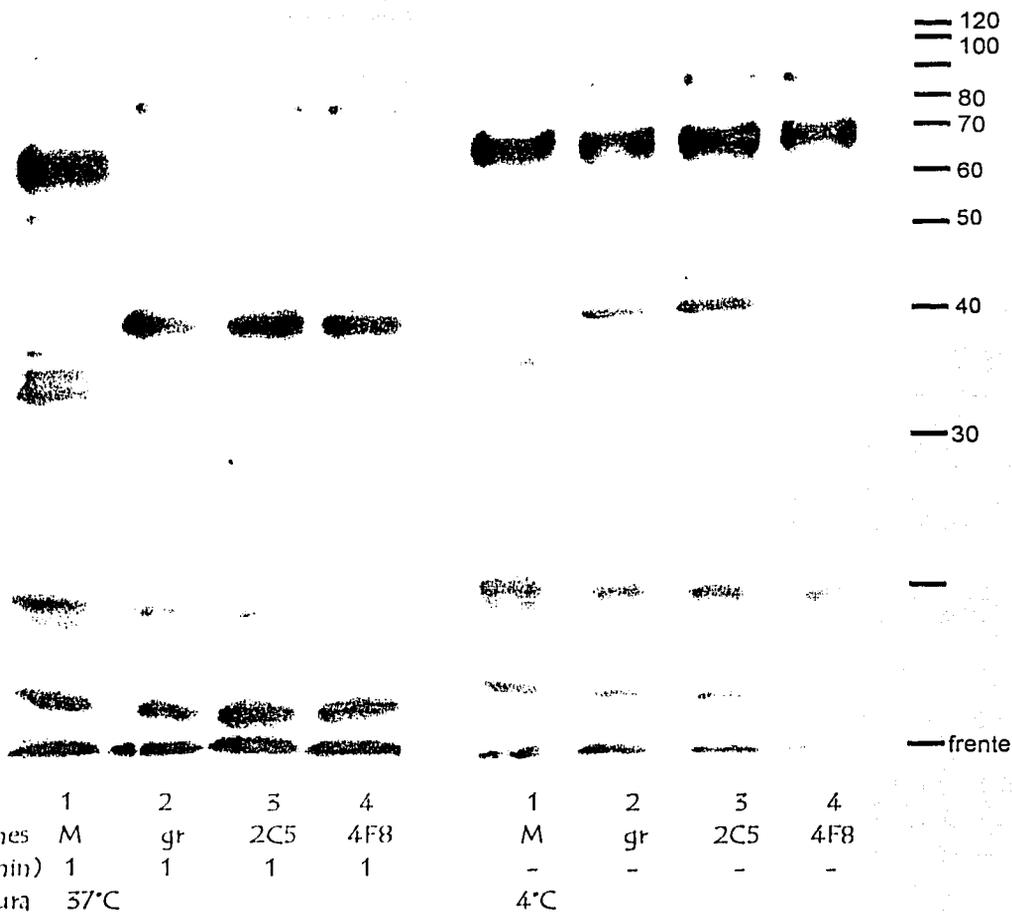
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Por ello se acepta que el estado de fosforilación de Syk, así como el de muchas cinasas, indica su estado de actividad.

Para analizar el estado de fosforilación de Syk, en respuesta al estímulo fagocítico generado por cada subclase de IgG, estimulamos a células de la línea J774 con eritrocitos opsonizados con cada subclase, o solo sensibilizados. Recuperamos el contenido celular de  $1 \times 10^7$  células y analizamos el estado de fosforilación de Syk por western blot anti-fosfotirosina (anti-PY). La banda que corresponde a Syk se identificó por peso molecular y analizando la membrana por western blot anti-Syk.

Primero establecimos que nuestras condiciones de estimulación fueran las óptimas y para ello estandarizamos el protocolo de estimulación. Nuestro protocolo se basa en el trabajo de Sobota en 2002<sup>82</sup>. Las condiciones de estimulación permiten definir el estado de fosforilación en residuos de tirosina tras la sola unión de la partícula (4°C), y con ello de la agregación de los receptores; o bien, el estado de fosforilación en residuos de tirosina cuando se inicia el proceso de fagocitosis (37°C), en este caso se permite que la célula continúe con la cascada de señalización que conduce a la internalización de la partícula. Nuestros resultados muestran que existen diferencias en los patrones de fosforilación entre células estimuladas y no estimuladas (Fig. 11). Cuando las partículas interactúan con los Fc $\gamma$ R se da la fosforilación en residuos de tirosina, rápida y transitoria, de muchas proteínas, de distintos pesos moleculares: 110-120, 90, 60, 40 y 30 kDa. Después, durante el proceso involucrado en la internalización de la partícula la cantidad de proteínas fosforiladas disminuye, pero se incrementa el estado de fosforilación de otras, como proteínas de un peso molecular aparente aproximado a 70 kDa. Esta banda no se observa en células no estimuladas; no cuando

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 11. Diferencias en el estado de fosforilación en tirosina de proteínas entre células estimuladas y no estimuladas.** Las células se mantuvieron en 10 ml de D-MEM sin suero fetal bovino (SFB) por 2 h a 37°C y 6.5% CO<sub>2</sub>. Se resuspenden a la densidad de 1 x 10<sup>7</sup> células/ml en D-MEM fresco sin SFB y se incuban por 10 min en frío. Pasado ese tiempo se agregan 1.5 ml de una suspensión al 4% de eritrocitos opsonizados, con la concentración hemaglutinante (1.875 µg/ml), para cada subclase de IgG y se mantienen en agitación constante a 4°C. Se incubaron 1 min a 37°C para permitir la señalización involucrada en la internalización de la partícula o bien se mantuvieron a 4°C para definir la señal asociada a la sola interacción entre la partícula y el receptor. Las células se lisan y se recupera la fracción soluble en detergente. Del sobrenadante se toman 100 µg de proteína total y se someten a electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Se realiza una transferencia a nitrocelulosa para detectar proteínas fosforiladas. Claves: M, macrófagos sin estimular; gr, macrófagos incubados con eritrocitos sensibilizados; 2C5, macrófagos estimulados con eritrocitos opsonizados con anticuerpo de la subclase IgG1 (2C5); 4F8, macrófagos estimulados con eritrocitos opsonizados con anticuerpo de la subclase IgG2b (4F8).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

se incubaron a 4°C ni cuando se incubaron a 37°C (carriles 1 de unión e internalización Fig. 11). Pero si se observa un cambio cuando las células se incuban con eritrocitos no opsonizados; sin embargo, el grado de fosforilación es menor al observado cuando las células se incuban con eritrocitos opsonizados (carriles 2 de unión e internalización Fig. 11)

Cuando se analizó el estado de fosforilación de la cinasa Syk en respuesta a la estimulación con eritrocitos opsonizados con anticuerpos de ambas subclases, no se observaron diferencias entre los patrones de fosforilación en residuos de tirosina inducidos por cada estímulo (Fig. 12 y 13). En respuesta al estímulo se da un incremento en el estado de fosforilación en residuos de tirosina de la enzima Syk que depende del tiempo de estimulación. Desde los 30 seg de estimulación (ver carril 5 en las figuras 12 y 13) se observa un incremento en el estado de fosforilación en residuos de tirosina de Syk, sobre el estado de fosforilación basal en células no estimuladas incubadas a 37°C (ver carril 3 en figuras 12 y 13) o sobre el estado de fosforilación de células estimuladas con eritrocitos no opsonizados (ver carril 4 en figuras 12 y 13). Este incremento se acentúa si las células son estimuladas por mas tiempo: 1, 3 y 5 min (ver carriles 6-8 en las figuras 12 y 13). El máximo de fosforilación en residuos de tirosina en respuesta a los dos estímulos (eritrocitos opsonizados con IgG1 o con IgG2b) se observa a los 3 min. Este patrón de fosforilación en la cinasa Syk asociado al tiempo de estimulación ha sido reportado en otros sistemas<sup>77</sup>. Sin embargo, a los 10 min de estimulación la fosforilación de Syk disminuye casi a niveles basales (carril 9 en las figuras 12 y 13). Al parecer el curso temporal de la fosforilación de Syk es diferente dependiendo de la subclase de IgG con la que se realice la estimulación. Aunque el valor máximo de fosforilación se da a los 3 min en ambos casos; al estimular con el

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Blot anti-PY



## Blot anti-Syk



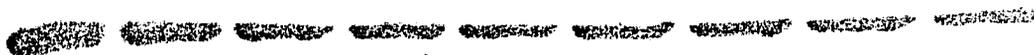
Carriles	1	2	3	4	5	6	7	8	9
M	*		*						
gr		*		*					
2C5					*	*	*	*	*
4°C	*	*							
37°C			*	*	*	*	*	*	*
tiempo (min)	-	-	5	5	0.5	1	3	5	10

**Figura 12. Estado de fosforilación de la proteína cinasa Syk en respuesta a la estimulación con eritrocitos opsonizados con anticuerpo de la subclase IgG1.** Las células se mantienen en cajas petri de cultivo en suspensión, con 10 ml de D-MEM sin suero fetal bovino (SFB) por al menos 2 h a 37°C y 6.5% CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo, se resuspenden a una densidad de  $1 \times 10^7$  células/ml en D-MEM fresco sin SFB y se incuban por 10 min en frío. Pasado ese tiempo se agregan 1.5 ml de una suspensión al 4% de eritrocitos opsonizados, con la concentración hemaglutinante (1.875 µg/ml), con cada uno de los subclases de IgG. Se realizaron incubaciones a distintos tiempos, a 37°C o bien 4 °C. Las células se lisan y se recupera la fracción insoluble mediante centrifugación. Del sobrenadante se cuantifica proteína y se someten a electroforesis 100 µg/ml por condición experimental, para después transferir a una membrana de nitrocelulosa y realizar un blot anti-fosfotirosina. La membrana se desnuda utilizando el buffer de stripping y se incuba con el anticuerpo anti-Syk de manera que se pueda obtener la relación entre proteína total y proteína fosforilada. Experimento representativo de 4 ensayos. Claves: M, macrófagos sin estimular; gr, macrófagos incubados con eritrocitos sensibilizados; 2C5, macrófagos estimulados con eritrocitos opsonizados con anticuerpo de la subclase IgG1 (2C5).

### Blot anti-PY

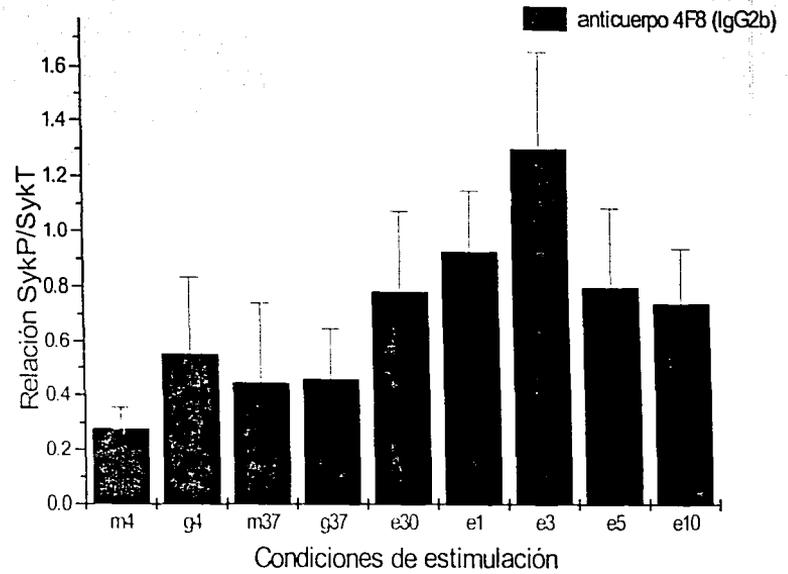
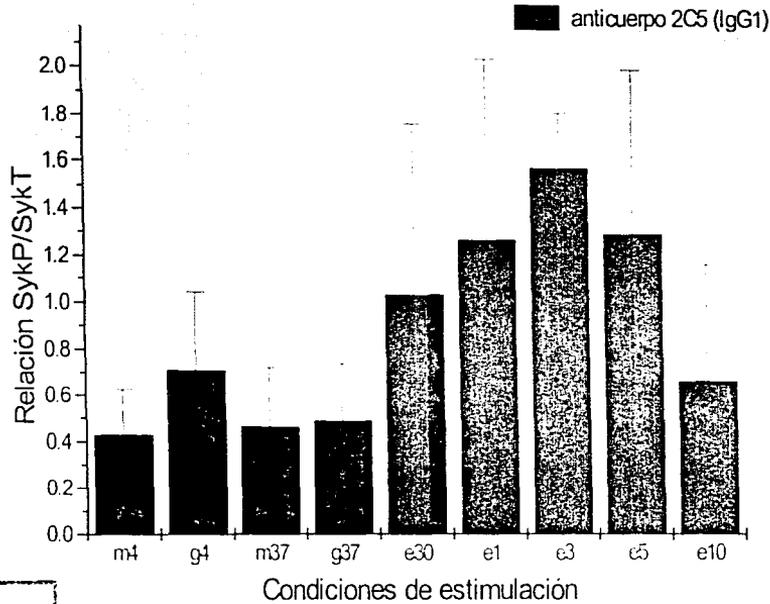


### Blot anti-Syk



Carriles	1	2	3	4	5	6	7	8	9
M	*		*						
gr		*		*					
4F8					*	*	*	*	*
4°C	*	*							
37°C			*	*	*	*	*	*	*
tiempo (min)	-	-	5	5	0.5	1	3	5	10

**Figura 13. Estado de fosforilación de la proteína cinasa Syk en respuesta a la estimulación con eritrocitos opsonizados con anticuerpo de la subclase IgG2b.** Las células se mantienen en cajas petri de cultivo en suspensión, con 10 ml de D-MEM sin suero fetal bovino (SFB) por al menos 2 h a 37°C y 6.5% CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo, se resuspenden a una densidad de 1 x 10<sup>7</sup> células/ml en D-MEM fresco sin SFB y se incuban por 10 min en frío. Pasado ese tiempo se agregan 1.5 ml de una suspensión al 4% de eritrocitos opsonizados, con la concentración hemaglutinante (1.875 µg/ml), con cada uno de los subclases de IgG. Se realizaron incubaciones a distintos tiempos, a 37°C o bien 4 °C. Las células se lisan y se recupera la fracción insoluble mediante centrifugación. Del sobrenadante se cuantifica proteína y se someten a electroforesis 100 µg/ml por condición experimental, para después transferir a una membrana de nitrocelulosa y realizar un blot anti-fosfotirosina. La membrana se desnuda utilizando el buffer de stripping y se incuba con el anticuerpo anti-Syk de manera que se pueda obtener la relación entre proteína total y proteína fosforilada. Experimento representativo de 4 ensayos. Claves: M, macrófagos sin estimular; gr, macrófagos incubados con eritrocitos sensibilizados; 4F8, macrófagos estimulados con eritrocitos opsonizados con anticuerpo de la subclase IgG2b (4F8).



**Figura 14. Relación entre la cantidad de Syk fosforilada vs Syk total.** El estado de fosforilación de Syk en células estimuladas con eritrocitos opsonizados con la subclase IgG1 muestra un desplazamiento temporal menos abrupto que el observado en células estimuladas con eritrocitos opsonizados con la subclase IgG2b. En la grafica se muestra la normalización entre la cantidad de Syk total y la cantidad de Syk fosforilada. Claves: m4, macrófagos sin estimular a 4°C; m37, macrófagos sin estimular a 37°C durante 5 min; g4, macrófagos incubados con eritrocitos sensibilizados a 4°C; g37, macrófagos incubados con eritrocitos sensibilizados a 37°C durante 5 min; e30, estimulación durante 30 seg a 37 °C con eritrocitos opsonizados; e1, estimulación durante 1 min a 37 °C con eritrocitos opsonizados; e3, estimulación durante 3 min a 37 °C con eritrocitos opsonizados; e5, estimulación durante 5 min a 37 °C con eritrocitos opsonizados; e10, estimulación durante 10 min a 37 °C con eritrocitos opsonizados.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

anticuerpo de la subclase IgG2b (4F8) el máximo de fosforilación se alcanza abruptamente, mientras que, al estimular con el anticuerpo de la subclase IgG1 (2C5) el máximo de fosforilación se alcanza paulatinamente.

Las diferencias observadas en el patrón de fosforilación en residuos de tirosina de Syk en respuesta a la estimulación no se explican por diferencias en el cargado de proteína por carril; en todos los carriles hay aproximadamente la misma cantidad de Syk total, como se puede observar en el inmunoblot anti Syk (Fig. 12 y 13).

Para poder definir si existían diferencias estadísticamente significativas entre el grado de fosforilación y el estímulo, se obtuvo la relación entre la absorbancia obtenida en cada banda del inmunoblot anti-PY con respecto a la absorbancia obtenida en la banda correspondiente del inmunoblot anti-Syk después de realizar densitometría. De esa manera se puede observar claramente la relación entre la cantidad total de Syk y la cantidad de Syk fosforilada en residuos de tirosina, para cada condición experimental. Los datos se presentan como la relación entre proteína fosforilada y proteína total ( $\text{ProteínaP/ProteínaTotal}$ ) y se muestra el promedio y la desviación estándar de tres experimentos (Fig. 14). El análisis de varianza indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre células no estimuladas y células estimuladas, particularmente a los 3 minutos de estimulación. Por desgracia la variación entre cada experimento genera una desviación estándar muy amplia, lo que no permite confirmar si existen las diferencias observadas entre los cursos temporales en la fosforilación de Syk inducida por cada subclase (Fig. 14). En cualquier caso parece evidente que la estimulación mediada por la subclase IgG1 induce un aumento en la fosforilación de Syk de casi la misma magnitud que la estimulación mediada por la subclase IgG2b.

Syk se activa mas rápido en respuesta a la estimulación mediada por la subclase IgG2b. Al analizar el estado de fosforilación de Syk en respuesta a la estimulación con cada subclase no se observaron diferencias que pudieran explicar la pobre eficiencia la subclase IgG1 para mediar fagocitosis. Aunque no pudimos confirmar si los cursos temporales en la fosforilación de Syk inducidos por cada subclase eran significativamente diferentes; al analizar cada experimento era muy claro que el patrón se mantenía y que las diferencias temporales existían.

Se sabe que la fosforilación en en residuos de tirosina está asociada con la activación de muchas enzimas, pero también es claro que "fosforilación" no es necesariamente sinónimo de "activación". Las cinasas de la familia Syk/ZAP-70 son susceptibles a fosforilación en tirosina en muchos sitios<sup>80</sup>, y si bien la fosforilación de alguno de ellos activa a la enzima<sup>173</sup>, la fosforilación en otros sitios le permite a Syk asociarse a cinasas o a proteínas multidominio<sup>173-175</sup>; o regulan negativamente su función<sup>79</sup>. Por esto decidimos analizar la actividad de la enzima Syk inmunoprecipitada en lisados de células estimuladas o no estimuladas con eritrocitos opsonizados con cada subclase. Con la enzima Syk inmunoprecipitada se realizan ensayos de actividad de cinasa *in vitro*. En este ensayo se determina la capacidad de la enzima para unir covalentemente, sobre un sustrato, fósforo marcado radiactivamente utilizando [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. Se analizó la autofosforilación de Syk (transfosforilación) (Fig. 15) y la fosforilación de un sustrato exógeno, la proteína básica de mielina (PBM) (Fig. 16).

Nuestros resultados muestran que la actividad de la cinasa Syk inducida por la estimulación con eritrocitos opsonizados con cada subclase, es diferente (Fig. 15 y 16).

Cuando las células son estimuladas con eritrocitos opsonizados, con el anticuerpo de la subclase IgG1 (2C5) se observa un incremento en la actividad de la cinasa a los tres minutos hasta alcanzar el máximo de actividad a los 5 min de estimulación. Este curso temporal se observó tanto en los ensayos de autofosforilación (carriles 3-6 de la figura 15), como en los ensayos de actividad de cinasa sobre la PBM (carriles 3-6 de la figura 16). En los ensayos de actividad de cinasa sobre PBM, es más evidente que, al minuto de activación la cinasa Syk está inactiva; la señal del  $\gamma$ -<sup>32</sup>P no es muy diferente a la observada en células no estimuladas incubadas a 37°C (ver carril 2 en figuras 15 y 16) o sobre el estado de fosforilación de células estimuladas con eritrocitos no opsonizados (ver carril 3 en figuras 15 y 16).

En cambio, cuando las células son estimuladas con eritrocitos opsonizados con el anticuerpo de la subclase IgG2b (4F8) se observa un incremento en la actividad de la cinasa desde el primer minuto de estimulación. La actividad a los 3 min de estimulación es menor. A los 10 min disminuye aún por debajo de los niveles basales de actividad. Este curso temporal se observó tanto en los ensayos de autofosforilación (carriles 7-9 de la figura 15), como en los ensayos de actividad de cinasa sobre la PBM (carriles 7-9 de la figura 16). En los ensayos de actividad de cinasa sobre PBM, es más evidente que, al minuto de estimulación se da la actividad máxima de la cinasa Syk y que a los 10 min se apaga completamente, de tal manera que no es posible detectar la señal.

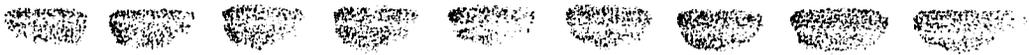
Las diferencias observadas en la actividad de Syk en respuesta a la estimulación no se explican por diferencias en el cargado de proteína por carril; en todos los carriles hay aproximadamente la misma cantidad de Syk total, como se puede observar en el inmunoblot anti Syk (Fig. 15 y 16).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Syk fosforilada



## Blot anti-Syk



Carriles	1	2	3	4	5	6	7	8	9
M	.	.							
gr			.						
2C5				.	.	.			
4F8							.	.	.
4°C	.								
37°C		.	.	.	.	.	.	.	.
tiempo (min) -		5	5	1	3	5	1	3	5

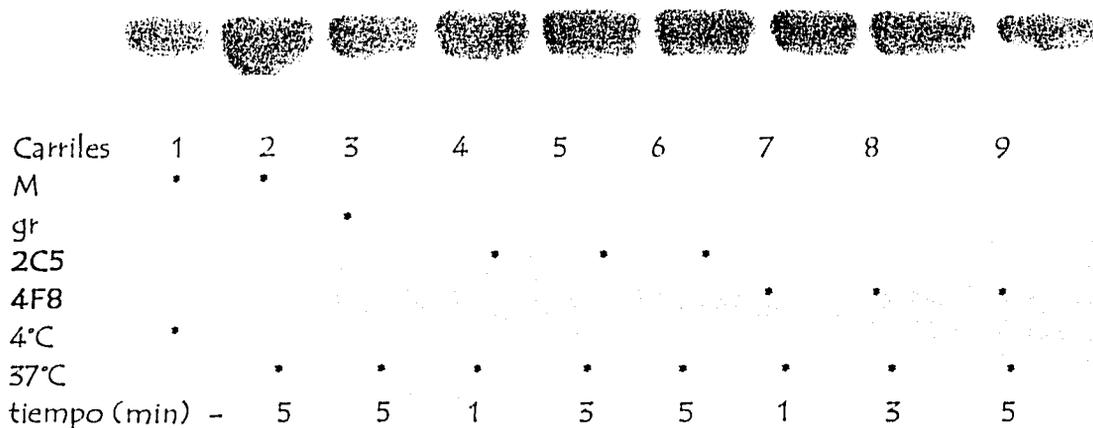
**Figura 15. Ensayo de actividad de cinasa *in vitro* de inmunoprecipitados anti-Syk de células estimuladas y no estimuladas.** Existen diferencias en la actividad de cinasa de Syk en inmunoprecipitados obtenidos de células estimuladas con eritrocitos opsonizados con anticuerpo de la subclase IgG1 (2C5) y la actividad de cinasa de Syk en inmunoprecipitados obtenidos de células estimuladas con eritrocitos opsonizados con anticuerpo de la subclase IgG2b (4F8). Las células se mantienen en cajas petri de cultivo en suspensión, con 10 ml de D-MEM sin suero fetal bovino (SFB) por al menos 2 h a 37°C y 6.5% CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo, se resuspenden a una densidad de 1 x 10<sup>7</sup> células/ml en D-MEM fresco sin SFB y se incuban por 10 min en frío. Pasado ese tiempo se agregan 1.5 ml de una suspensión al 4% de eritrocitos opsonizados, con la concentración hemaglutinante (1.875 µg/ml), con cada uno de los subclases de IgG. Se realizaron incubaciones a distintos tiempos, a 37°C o bien 4 °C. Las células se lisan y se recupera la fracción insoluble mediante centrifugación. Del sobrenadante se inmunoprecipita Syk y se realiza el ensayo de cinasa *in vitro*. Se agrega el buffer Laemmli y se hierven las muestras. El sobrenadante se recupera y se somete a electroforesis, para después transferir a una membrana de nitrocelulosa y revelar por autoradiografía. Para después realizar un blot anti-Syk. Experimento representativo de 3 ensayos. Claves: M, macrófagos sin estimular; gr, macrófagos incubados con eritrocitos sensibilizados; 2C5, macrófagos estimulados con eritrocitos opsonizados con anticuerpo de la subclase IgG1 (2C5); 4F8, macrófagos estimulados con eritrocitos opsonizados con anticuerpo de la subclase IgG2b (4F8).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

9/1

## PBM fosforilada

## Blot anti-Syk

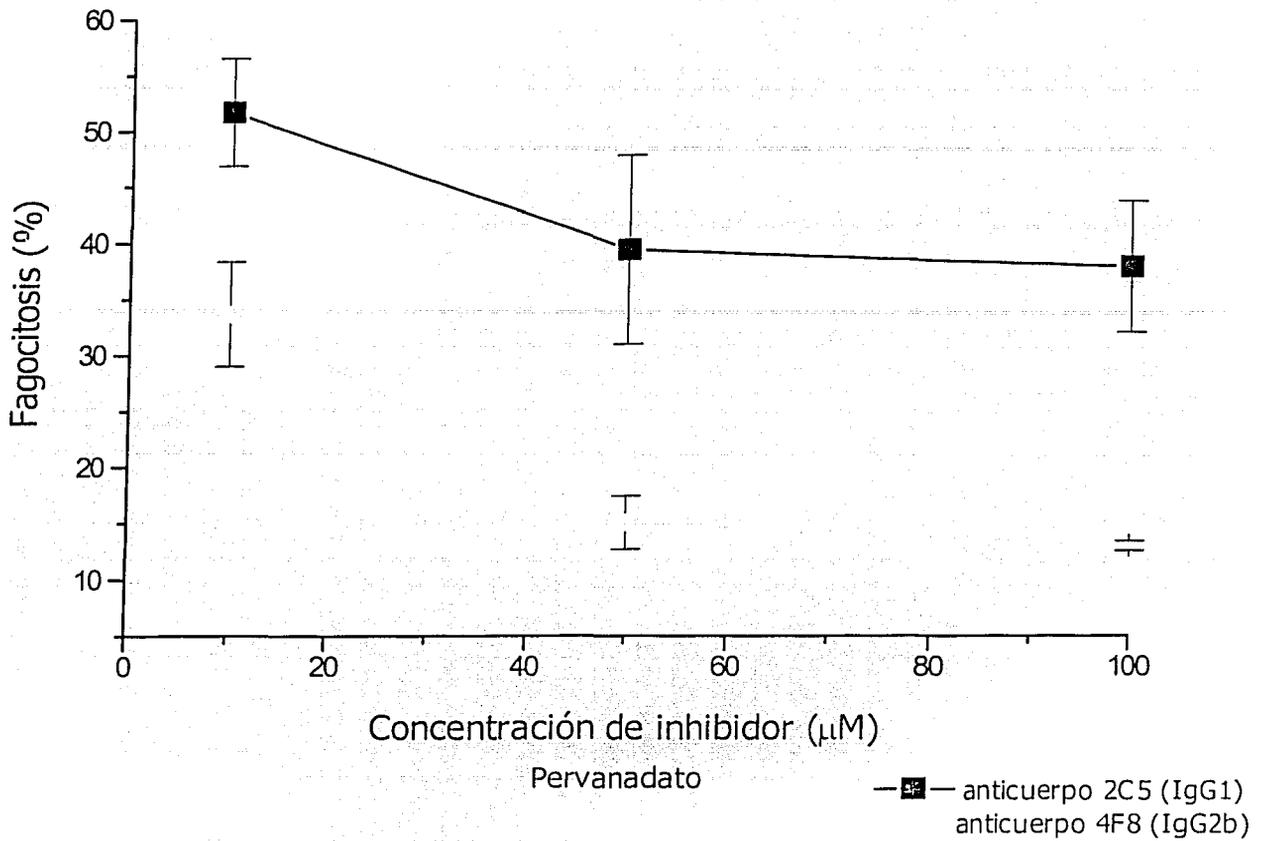


**Figura 16. Ensayo de actividad de cinasa *in vitro* sobre PBM de inmunoprecipitados anti-Syk de células estimuladas y no estimuladas.** Existen diferencias en la actividad de cinasa de Syk en inmunoprecipitados obtenidos de células estimuladas con eritrocitos opsonizados con anticuerpo de la subclase IgG1 (2C5) y la actividad de cinasa de Syk en inmunoprecipitados obtenidos de células estimuladas con eritrocitos opsonizados con anticuerpo de la subclase IgG2b (4F8). Las células se mantienen en cajas petri de cultivo en suspensión, con 10 ml de D-MEM sin suero fetal bovino (SFB) por al menos 2 h a 37°C y 6.5% CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo, se resuspenden a una densidad de 1 x 10<sup>6</sup> células/ml en D-MEM fresco sin SFB y se incuban por 10 min en frío. Pasado ese tiempo se agregan 1.5 ml de una suspensión al 4% de eritrocitos opsonizados, con la concentración hemaglutinante (1.875 µg/ml), con cada uno de los subclases de IgG. Se realizaron incubaciones a distintos tiempos, a 37°C o bien 4 °C. Las células se lisan y se recupera la fracción insoluble mediante centrifugación. Del sobrenadante se inmunoprecipita Syk y se realiza el ensayo de cinasa *in vitro* sobre PBM. Se agrega el buffer Laemmli y se hierven las muestras. El sobrenadante se recupera y se somete a electroforesis, para después transferir a una membrana de nitrocelulosa y revelar por autoradiografía. Para después realizar un blot anti-Syk. Claves: M, macrófagos sin estimular; gr, macrófagos incubados con eritrocitos sensibilizados; 2C5, macrófagos estimulados con eritrocitos opsonizados con anticuerpo de la subclase IgG1 (2C5); 4F8, macrófagos estimulados con eritrocitos opsonizados con anticuerpo de la subclase IgG2b (4F8).

La inhibición de la actividad de fosfatasa tiene distinto efecto sobre la fagocitosis inducida por cada anticuerpo. Además de la fosforilación de proteínas por cinasas, la defosforilación esta involucrada en regular la actividad enzimática de Syk<sup>80</sup> y se sabe que la capacidad para mediar funciones efectoras del Fc $\gamma$ R involucra la actividad de fosfatasas<sup>62</sup>. Algunas fosfatasas citosólicas pueden asociarse a la maquinaria enzimática involucrada en la señalización mediada por los ITAMs e ITIMs<sup>176-177</sup>. Por lo anterior, se planteó que la actividad de fosfatasa podría estar involucrada en la regulación de la fagocitosis; por lo que decidimos inhibir la actividad de estas enzimas para determinar el efecto sobre la fagocitosis inducida por los anticuerpos de cada subclase.

Para ello utilizamos el compuesto pervanadato, que inhibe la actividad de fosfatasa con una especificidad diferente a la del vanadato y cuyo efecto se observa en células intactas<sup>178</sup>.

Las células J774 fueron tratadas con distintas concentraciones del inhibidor pervanadato (10, 50 y 100  $\mu$ M), o con el vehículo DMSO (Fig. 17). Las células tratadas fueron estimuladas con eritrocitos opsonizados con cada anticuerpo, usando para ambos la concentración hemaglutinante de 1.875 $\mu$ g/ml o con eritrocitos sensibilizados. La fagocitosis de eritrocitos opsonizados con el anticuerpo de la subclase IgG1 (2C5), al igual que con el anticuerpo de la subclase IgG2b (4F8), fue inhibida de manera dosis dependiente (Fig. 17), pero los valores máximos de inhibición para cada anticuerpo fueron distintos. El valor máximo de inhibición para el anticuerpo de la subclase IgG1 fue de 60%, mientras que para el anticuerpo 4F8 fue del 85%. A la concentración de



**Figura 17. Efecto del inhibidor general de fosfatasa, el pervanadato, sobre la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R.** La fagocitosis mediada por la subclase IgG1 (2C5) es menos sensible al efecto del pervanadato. Se utilizaron las concentraciones de 10, 50 y 100  $\mu$ M de pervanadato, incubando por 5 min previos al estímulo fagocítico, a 37°C y 6.5% de CO $_2$ . Como control de vehículo se empleó la concentración máxima de DMSO y se incubó en las mismas condiciones. Los datos representan la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R, para ello se eliminó el valor de la fagocitosis obtenida en células tratadas con DMSO que se incubaron con eritrocitos sensibilizados. Los datos están normalizados tomando como 100% la fagocitosis obtenida en células no tratadas con pervanadato y que se incubaron con eritrocitos opsonizados con cada subclase. Se muestra el promedio y la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

inhibidor mas baja, 10  $\mu$ M se alcanza el 50% de inhibición de la fagocitosis ( $IC_{50}$ ) para ambas subclases.

**SHP-1 permanece asociada a la cinasa Syk por mas tiempo cuando la estimulación es mediada por la subclase IgG1.** Una de las fosfatasa que participa en la señalización mediada por los  $Fc\gamma R$  es la fosfatasa SHP-1<sup>141</sup>. SHP-1 se asocia al ITIM y se ha propuesto que participa en la regulación negativa de la vía. En macrófagos knockout para  $Fc\gamma RII$  se observó que la cascada de señales generada con la activación de este receptor regula negativamente la fagocitosis mediada por los receptores  $Fc\gamma RI$  y  $Fc\gamma RIII$ <sup>179</sup>. La sobreexpresión de SHP-1 en macrófagos murinos de la línea celular J774, evita la fagocitosis mediada por los  $Fc\gamma R$ <sup>138</sup>. SHP-1 se puede asociar a Syk y por ello se propone como candidato para regular el patrón de fosforilación de Syk y con ello su actividad<sup>180</sup>. Por ello nos propusimos determinar si la vía de señalización activada con la agregación de receptores, mediada por las partículas opsonizadas con cada subclase, involucraba a SHP-1 y si podíamos observar su interacción física con la cinasa Syk. Para observar la asociación de SHP-1 con Syk y analizar su comportamiento cuando las células eran estimuladas con eritrocitos opsonizados con ambas subclases, inmunoprecipitamos a Syk y realizamos un inmunoblot anti-PTP. Con este procedimiento capturamos a Syk y a todas aquellas moléculas que se le asocian firmemente. Nuestros resultados sugieren que la fosfatasa SHP-1 se encuentra asociada a Syk de manera constitutiva, como lo muestran los inmunoprecipitados de Syk de células en reposo (carriles 1-3 de la figura 18). Tras la estimulación la asociación de SHP-1 se modifica. Cuando las células son estimuladas con eritrocitos

## Blot anti-PTP

SHP-1 — 

## Blot anti-Syk



Carriles	1	2	3	4	5	6	7	8	9
M	•	•							
gr			•						
2C5				•	•	•			
4F8							•	•	•
4°C	•								
37°C		•	•	•	•	•	•	•	•
tiempo (min) -		5	5	1	3	5	1	3	5

**Figura 18. Asociación de la fosfatasa SHP con la cinasa Syk en inmunoprecipitados anti-Syk de células estimuladas con eritrocitos opsonizados con cada subclase.** El tiempo asociación si se modifica cuando las células son estimuladas con eritrocitos opsonizados. Se observa que la cantidad y el tiempo por el cual se mantiene asociada SHP a Syk en células estimuladas con IgG1 (2C5) es mayor que cuando las células son estimuladas con IgG2b (4F8). Las células se lisan con una solución de Tris 50 mM pH 7.2, 1% de tritón X-100 y 0.1 de SDS; y los inhibidores enzimáticos a 4°C. Se recupera la fracción soluble en detergente por centrifugación. El sobrenadante que se recupera se incuba toda la noche con 2 µg/ml del anticuerpo anti-Syk (N19, este anticuerpo reconoce la región amino terminal de la cinasa Syk). Para después incubar con proteína A-sefarosa. El inmunoprecipitado se somete a electroforesis y después se trasfiere a nitrocelulosa, para incubar con anticuerpo anti-PTP y revelar por quimioluminiscencia. La banda corresponde al peso molecular reportado para SHP-1. Claves: M, macrófagos sin estimular; gr, macrófagos incubados con eritrocitos sensibilizados; 2C5, macrófagos estimulados con eritrocitos opsonizados con anticuerpo de la subclase IgG1 (2C5); 4F8, macrófagos estimulados con eritrocitos opsonizados con anticuerpo de la subclase IgG2b (4F8).

opsonizados con el anticuerpo de la subclase IgG1 (2C5) esta asociación se mantiene durante el primer minuto de estimulación, y disminuye a los 3 min de estimulación, para casi desaparecer a los 5 min de estimulación (carriles 4-6 de la figura 18).

En cambio tras la estimulación con eritrocitos opsonizados con el anticuerpo de la subclase IgG2b (4F8) esta asociación disminuye desde el primer minuto de estimulación y la señal de SHP no se detecta posteriormente (carriles 7-9 de la figura 18). Las diferencias observadas en la asociación entre Syk y SHP en respuesta a la estimulación no se explican por diferencias en el cargado de proteína por carril; en todos los carriles hay aproximadamente la misma cantidad de Syk total, como se puede observar en el inmunoblot anti Syk (Fig. 18).

Esto correlaciona con las observaciones de los ensayos de actividad de cinasa *in vitro*. En las células que fueron estimuladas con eritrocitos opsonizados con IgG1, el aumento en la actividad de Syk es inversamente proporcional al grado de asociación entre la fosfatasa SHP-1 y Syk. A su vez, cuando las células que fueron estimuladas con eritrocitos opsonizados con IgG2b, el aumento en la actividad de Syk se dio desde el primer minuto de estimulación cuando la cantidad de SHP-1 asociada a Syk es mínima (Fig. 16 y 18).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DISCUSIÓN

Los macrófagos son elementos esenciales del sistema inmunológico. Forman parte de las primeras defensas y están involucrados en la activación y regulación de mecanismos de la respuesta inmune adaptativa, al secretar mediadores proinflamatorios y citocinas<sup>2</sup>.

La capacidad fagocítica de los macrófagos está relacionada con la expresión de receptores especializados, como los Fc $\gamma$ R, y la maquinaria enzimática que participa en la señalización mediada por ellos<sup>181</sup>. Los Fc $\gamma$ R unen la porción Fc de las inmunoglobulinas clase G, IgG<sup>182</sup>. Los Fc $\gamma$ R pertenecen a una superfamilia de receptores involucrados en el reconocimiento del antígeno<sup>27</sup>. Tanto el humano como el ratón expresan distintos tipos de receptores. El receptor Fc $\gamma$ RI, es el receptor de alta afinidad para IgG y puede unirla monoméricamente con una constante de afinidad de  $10^8 \text{ M}^{-1}$ . Los receptores Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII, son receptores de baja afinidad para IgG y no la unen monoméricamente con una afinidad mensurable. Estos receptores pueden unir complejos de IgG. Muchas células expresan más de un tipo de receptor Fc $\gamma$ R, capaces de mediar fagocitosis<sup>43</sup>. Si esto no fuera suficiente para complicar el esquema, cada receptor une con distinta preferencia a las distintas subclases de IgG<sup>51-52</sup>. En el sistema murino el Fc $\gamma$ RI une preferentemente a la subclase IgG3. La subclase IgG1 señala preferentemente a través del receptor Fc $\gamma$ RIII. La subclase IgG2 (IgG2a e IgG2b) señala preferentemente a través del Fc $\gamma$ RII, pero también puede hacerlo a través del receptor Fc $\gamma$ RI; además la IgG2a puede señalar a través del receptor Fc $\gamma$ RIII<sup>51-52</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los primeros eventos inducidos por la agregación de los receptores FcγR involucran el reclutamiento de cinasas citoplásmicas que inician una cascada de fosforilación en tirosina. Esta cascada de señalización regula una amplia gama de enzimas que regulan muchas de las repuestas celulares que puede dar el macrófago<sup>72-73</sup>. Durante el estudio de las respuestas celulares inducidas por la agregación de estos receptores se emplearon anticuerpos monoclonales específicos para estimular a cada receptor. Esto permitió descifrar parte de las cascadas bioquímicas generadas y los requerimientos mínimos para activar a la célula. Con esto también se confirmó que cualquier ligando capaz de inducir la agregación de los receptores genera respuestas celulares<sup>1</sup>. Sin embargo, no hemos logrado entender cómo las diferencias en los agregados (en su estructura, tamaño, vida media, etc) afectan el proceso. Algunos datos experimentales sugieren que las propiedades estructurales del agregado influyen en la respuesta que se genere<sup>34-37</sup>. Se observó que dímeros estructuralmente diferentes del receptor FcεR generaban, con distinta eficiencia, diversas respuestas celulares<sup>38-40</sup>. Al analizar la cascada de señalización inducidas por estos anticuerpos se encontró un nuevo paso de regulación en la señalización inducidas por la activación del receptor FcεRI. Este paso de regulación involucra la disociación de la cinasa Lyn de los complejos de receptores agregados<sup>41</sup>.

Estos resultados apoyan la idea de que no hay una relación simple entre el número de receptores agregados y la respuesta efectora, sino que otros factores (diferencias de conformación del agregado y/o de orientación de las subunidades de los receptores entre sí, así como dinámicos) pueden determinar la respuesta. Bajo esta premisa, para estudiar la activación a través de receptores para IgG, se generaron

TRABAJOS CON  
FALLA DE ORIGEN

anticuerpos monoclonales específicos para el 2,4-dinitrofenol<sup>143</sup>. Se encontró que anticuerpos de la subclase IgG1 eran menos eficientes que anticuerpos de la subclase IgG2b para mediar la fagocitosis de eritrocitos opsonizados, no obstante que presentaban la misma constante de unión por el hapteno, opsonizaban en la misma proporción a la partícula y en consecuencia interaccionaban de la misma manera con células fagocíticas (macrófagos)<sup>144</sup>. Estos eventos presentan distinta susceptibilidad a inhibidores específicos para cinasas de las familias PKC y PI-3K<sup>145</sup>. ¿Cuál es la razón de por qué anticuerpos de distintas subclases medien con distinta eficiencia fagocitosis?

Dado que distintos anticuerpos de la misma subclase presentan las mismas características; es decir, no es un fenómeno particular a los anticuerpos 2C5 (IgG1) y 4F8 (IgG2b), una posible explicación sería que las diferencias estructurales entre las subclases de IgG que les confieren distinto grado de flexibilidad, también les permitan interaccionar de distinta manera con los receptores y que esto se traduzca en la formación de homo o heteroagregados de los receptores con distintas características estructurales y distinta capacidad para transducir señales.

Esto sugiere que existen diferencias en las vías de activación celular inducidas por la agregación de las partículas opsonizadas con anticuerpos de cada subclase y por eso median con diferente eficiencia la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R. Para probar esta hipótesis se analizó comparativamente la participación de distintas enzimas en las vías de señalización inducidas por la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con un anticuerpo monoclonal de la subclase IgG1 (2C5) y con uno de la subclase IgG2b (4F8).

Existen reportes que la actividad de PKC es necesaria para que se lleve a cabo la fagocitosis inducida por los  $Fc\gamma R$ <sup>135</sup>. La fagocitosis procede normalmente en ausencia de  $Ca^{2+}$  y se incrementa si las células son tratadas con esteroides de forbol<sup>161,183</sup>. Esto concuerda con los cofactores requeridos por las isoformas nuevas de PKC. Estas isoformas de la familia PKC son reclutadas durante la diferenciación del linaje monocítico y se asocian con la eficiente fagocitosis realizada por los macrófagos<sup>184</sup>.

Datos previos sugieren que la pobre fagocitosis mediada por la subclase IgG1 se debe a que este estímulo fagocítico no es capaz de activar eficientemente a PKC. Cuando las células se trataron con el inhibidor R0 318220 (que inhibe la actividad de las cinasas de la familia PKC, sin discriminar entre las isoformas<sup>155-160</sup>), la fagocitosis inducida por anticuerpos de las subclases IgG1 e IgG2b fue inhibida en mismo grado y de manera dependiente de la dosis. Cuando las células fueron tratadas con el inhibidor GF109203X (que inhibe la actividad de PKC, pero afecta a distintas concentraciones a las subfamilias<sup>163-166</sup>), la fagocitosis inducida por cada anticuerpo se inhibió de modo diferente. La fagocitosis inducida por el anticuerpo de la subclase IgG1 (2C5) fue inhibida a concentraciones que inhiben a las isoformas nuevas de PKC, mientras que la fagocitosis inducida por el anticuerpo de la subclase IgG2b (4F8) fue inhibida a concentraciones que sólo afectan a las isoformas clásicas de PKC<sup>145</sup>. Esto sugirió que las distintas isoformas participaban de distinta manera en la fagocitosis de partículas opsonizadas con anticuerpos de las subclases IgG1 e IgG2b; resulta interesante el hecho de que los anticuerpos de la subclase IgG1 no median fagocitosis eficientemente y la conclusión es que este fenómeno se asocia a la falta de activación de las isoformas nuevas de PKC.

Para determinar el efecto que tenía la eficiente activación de las isoformas nuevas de PKC en la fagocitosis mediada por los anticuerpos de la subclase IgG1, se ideó un sistema de complementación farmacológica. En este sistema se activaría exógenamente a las isoformas de PKC dependientes de DAG usando PMA<sup>167</sup>, y se observaría el efecto sobre la fagocitosis en respuesta a la activación de los FcγR. Nuestros resultados muestran que la fagocitosis mediada por anticuerpos de la subclase IgG1 se incrementa con el tratamiento con PMA y que este incremento es mayor que el observado en la fagocitosis mediada por la subclase IgG2b. El incremento en la fagocitosis mediada por la subclase IgG1 en células tratadas con PMA es tal que casi iguala la fagocitosis mediada por la subclase IgG2b en condiciones normales, aunque no llega a la saturación (Fig. 9). Esto sugiere que las células no han perdido la capacidad para responder a un estímulo cuando interaccionan con los eritrocitos opsonizados con el anticuerpo de la subclase IgG1. Además, confirma el hecho de que el estímulo dado con el anticuerpo de la subclase IgG1 no activa eficientemente a las cinasas de la familia PKC involucradas en la fagocitosis.

Se sabe que cuando las células son tratadas con PMA se favorece la formación de complejos macromoleculares involucrados en la fagocitosis mediada por los FcγR<sup>142</sup> y en la señalización del TCR<sup>185</sup>, que involucran a la proteína adaptadora Cbl y a la cinasa Syk. En condiciones normales la estimulación de los FcγR conduce a la activación de la cinasa Syk<sup>168</sup>. Este es un evento muy importante en la fagocitosis pues si se bloquea la actividad de Syk empleando inhibidores específicos para esta enzima se abate la fagocitosis. Tampoco se lleva a cabo la fagocitosis si se impide la expresión de Syk usando oligonucleótidos antisentido ó en macrófagos de ratones Syk<sup>-/-</sup><sup>73</sup>. Se

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

han observado variaciones en la capacidad fagocítica de los distintos FcγR debidas a diferencias en su interacción con Syk o debidas a la regulación de la enzima<sup>84</sup>. Por eso, en este trabajo se analiza el estado de fosforilación de Syk y su actividad. Se sabe que Syk es fosforilada en respuesta a la agregación los receptores FcγR<sup>168-169</sup> por la actividad de la cinasa Lyn<sup>80</sup>. Para analizar el estado de fosforilación de Syk, se estimularon células de la línea J774 con eritrocitos opsonizados con cada subclase, o solo sensibilizados y se analizó el estado de fosforilación de Syk por western blot anti-PY. Nuestros resultados no muestran diferencias entre los patrones de fosforilación inducidos por cada estímulo (Fig. 12 y 13); aunque al parecer el curso temporal de la fosforilación de Syk es diferente dependiendo de la subclase de IgG con la que se realice la estimulación.

Para analizar la actividad de Syk, se estimularon células de la línea J774 con eritrocitos opsonizados con cada subclase, o solo sensibilizados y se analizó la capacidad de Syk para unir fósforo marcado radiactivamente utilizando [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. Como sustrato se empleó a la propia Syk (transfosforilación) o a la proteína básica de mielina. Nuestros resultados muestran que la actividad de la cinasa Syk inducida por la estimulación con eritrocitos opsonizados con cada subclase, tiene una cinética diferente (Fig. 15 y 16). Cuando el estímulo se da con el anticuerpo de la subclase IgG2b, la actividad de Syk se observa desde el primer minuto de estimulación. En cambio, el estímulo dado con el anticuerpo de la subclase IgG1 se retarda hasta alcanzar el máximo de actividad a los 5 min de estimulación. Esto podría señalar las diferencias importantes entre la cascada de señalización inducida por la subclase IgG1 y la

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

inducida por la subclase IgG2b e indicar la razón del porque median con distinta eficiencia la fagocitosis de partículas.

La relevancia de la diferente actividad de Syk en la fagocitosis de partículas opsonizadas con anticuerpos de la subclase IgG1 radica en que Syk por sí misma es capaz de mediar fagocitosis<sup>186-187</sup>. Esto no ocurre en el caso de los miembros de la familia Src, pues es necesario generar triples deficientes para  $Hck^{-/-}$ ,  $Fgr^{-/-}$  y  $Lyn^{-/-}$  para observar una disminución en la fagocitosis mediada por los  $Fc\gamma R^{74}$ . Syk y Lyn son activados secuencialmente durante la fagocitosis mediada por los  $Fc\gamma R^{188}$ . Lyn se acumula en la zona en donde se dio el reconocimiento primario. Esta interacción se da aún cuando las células son incubadas a 4°C. En cambio, Syk se asocia a la zona perifagosomal cuando se da la internalización de la partícula (20°C)<sup>62,82</sup>. La agregación de Lyn parece ser independiente de la respuesta celular y podría ser explicada a través de su asociación con los microdominios de membrana y el papel que estos juegan en la señalización mediada por los receptores para antígeno<sup>189</sup>. En cambio Syk necesita asociarse a las tirosinas fosforiladas de los ITAM<sup>80</sup>.

¿Quién está regulando la actividad de Syk al estimular a las células con partículas opsonizadas con el anticuerpo de la subclase IgG1? Algunos datos indican que en la regulación de la actividad de la cinasa Syk participan los propios receptores. Es a través de las tirosinas de la secuencia ITAM que el receptor puede modular la respuesta. Esto lo sugieren experimentos en donde la mutación de residuos de tirosina de la secuencia ITAM presentes en los receptores  $Fc\gamma RI/ Fc\gamma RIII$  murinos abate la fagocitosis. Además, estos estudios arrojaron datos que indican que las características en la secuencia ITAM puede modificar la forma en cómo interacciona con ellos la cinasa

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Syk. Cuando se mutó la primer tirosina en el ITAM del Fc $\gamma$ RIIA, se reduce la fagocitosis, pero no es eliminada<sup>84</sup>. Muchos datos sugieren que los dominios SH2 presentes en moléculas efectoras tienen distinta afinidad por la secuencia de la región ITAM<sup>170,190-192</sup>. Y no solo eso, se ha observado que las regiones contiguas al ITAM también pueden regular la asociación entre el receptor y moléculas efectoras (por ejemplo Syk), así como la respuesta del receptor<sup>84</sup>. Se sabe que Lyn se debe disociar de los ITAM fosforilados para permitir que Syk se ancle a estos sitios. La eficiencia en la disociación de Lyn del receptor depende del grado de fosforilación del ITAM<sup>41</sup>. La forma en como Syk se asocia a las secuencias ITAM podría explicar el hecho que Syk no sea activada de la misma manera en respuesta a la estimulación mediada por los anticuerpos de la subclase IgG1, pero esto no dice quién la está regulando. Al parecer en este proceso también están involucrados los receptores y la estructura de la cinasa Syk.

Se sabe que al asociarse Syk a la secuencia ITAM es fosforilada en residuos de tirosina por cinasas de la familia Src<sup>168-169</sup>. En estos sitios fosforilados, distintas proteínas se asocian a Syk a través de sus dominios SH2<sup>80</sup>. Syk se asocia físicamente y es sustrato de la fosfatasa SHP-1<sup>180</sup>. La accesibilidad de Syk a SHP-1 también está regulada por los receptores Fc $\gamma$ R y las secuencias ITIM. En ensayos *in vitro* se observó que la asociación de SHP-1 al receptor Fc $\gamma$ RIIB depende del grado de fosforilación de las secuencias ITIM y de la densidad del receptor<sup>149</sup>. Todavía no es claro cómo funciona la vía de regulación entre Syk y SHP-1. SHP-1 regula negativamente la señalización mediada por el BCR<sup>180</sup>, y en el caso de la señalización mediada por los Fc $\gamma$ R se sabe que la activación de Syk induce la fosforilación de la proteína adaptadora Cbl y que SHP-1 la defosforila. La fosforilación de Cbl induce el reclutamiento de CRKL

a la maquinaria enzimática<sup>138</sup>. Esto permite la asociación de PI-3K a los complejos del receptor y su activación<sup>193</sup>. Cuando Cbl es defosforilada por SHP-1<sup>194</sup>, la vía se detiene. La defosforilación de Cbl suprime la activación de Rac y en consecuencia se detiene el rearrreglo del citoesqueleto<sup>138</sup>. Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que la estimulación mediada por los anticuerpos de la subclase IgG1 también fallan en la activación de PI-3K<sup>145</sup>. El que la señal no llegue a PI-3K sugiere que SHP-1 está involucrada en la regulación de la vía generada por la estimulación con el anticuerpo de la subclase IgG1.

Por todo lo anterior se determinó si en nuestro sistema Syk y SHP-1 estaban asociadas y si correlacionaba su asociación con la actividad de Syk. Para ello estimulamos a células de la línea J774 con eritrocitos opsonizados con ambas subclases o sólo sensibilizados; inmunoprecipitamos a Syk y realizamos un inmunoblot anti-PTP. Nuestros resultados sugieren que la fosfatasa SHP-1 se encuentra asociada a Syk de manera constitutiva (carriles 1-3 de la figura 18), y que tras la estimulación la asociación se modifica. Cuando las células son estimuladas con eritrocitos opsonizados con el anticuerpo de la subclase IgG1 (2C5) esta asociación se mantiene durante más tiempo que cuando se estimula usando eritrocitos opsonizados con el anticuerpo de la subclase IgG2b (4F8) (carriles 4-9 de la figura 18). Estos resultados apoyan nuestra hipótesis. La estimulación con cada anticuerpo, activa de distinta manera las vías de señalización. Las principales diferencias se dan en el transcurso temporal de los eventos generados por cada estímulo.

Pero, hay otros datos que deben ser considerados para entender el curso temporal de estos eventos, que involucran tanto a los receptores como a la maquinaria enzimática. Cuando se da la interacción entre los Fc $\gamma$ R y la partícula opsonizada se

observa la fosforilación en residuos de tirosina de muchas proteínas. Después, durante la internalización el nivel de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina disminuye (Fig. 11). Este fenómeno ya ha sido reportado. Durante la estimulación de los Fc $\gamma$ R se pueden distinguir dos eventos: el entrecruzamiento de los receptores y la agregación de los receptores en la zona de reconocimiento. El entrecruzamiento se da a 4°C. La agregación requiere la movilización de los parches de receptores hacia una región particular en la célula lo que involucra la movilización del citoesqueleto de actina y polariza a la célula<sup>195-196</sup>. La estimulación del receptor Fc $\gamma$ RII, en células U937, correlaciona con eventos de fosforilación en residuos de tirosina; mientras que, la agregación está acompañada por eventos de defosforilación<sup>197</sup>. La inhibición de la actividad de proteínas fosfatasas causa una hiperfosforilación en residuos de tirosina que coincide con un impedimento de la movilización de los receptores estimulados hacia los agregados<sup>197</sup>. Nuestros resultados muestran que la fagocitosis inducida por la estimulación con el anticuerpo de la subclase IgG1 es menos susceptible al tratamiento con pervanadato (inhibidor general de la actividad de fosfatasas), que la fagocitosis inducida por la estimulación con el anticuerpo de la subclase IgG2b (Fig. 17). Esto sugiere que la estimulación inducida por los eritrocitos opsonizados con la subclase IgG1 no induce con eficiencia la formación de agregados del receptor y la polarización de la célula. Este evento podría involucrar a SHP-1 y su papel en la regulación del rearreglo del citoesqueleto<sup>138</sup>.

Nuestros resultados muestran que durante la activación inducida por el anticuerpo de la subclase IgG1, el complejo Syk/SHP se mantiene por más tiempo; tal vez esto regula la activación de la fosfatasa de tal manera que le permite actuar sobre

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Syk modificando su patrón de fosforilación, su actividad, el tipo de moléculas que se asocien a ella y/o la preferencia de Syk sobre un sustrato en particular. En otros sistemas, se ha observado que al tratar a las células con pervanadato, la proteína SHP-1 se mantiene unida al receptor FcγRIIB; bajo tales condiciones la fosfatasa se mantiene inactiva y se detiene la señal del receptor<sup>149</sup>.

Los procesos de regulación negativa no están sólo involucrados en "apagar" la respuesta, también controlan su magnitud o podrían dirigir la señal hacia la generación de otra respuesta. La diferenciación del monocito genera al macrófago, una célula con tal capacidad fagocítica y citotóxica que es necesario modular la magnitud de su respuesta para que solo represente un beneficio al hospedero. Muchos datos indican que la respuesta es regulada a través de los receptores FcγR. Los macrófagos de la línea celular J774 expresan todos los tipos de receptor FcγR; todos ellos son capaces de mediar fagocitosis<sup>43</sup>. Como ellos se pueden encontrar muchos tipos celulares en cualquier organismo multicelular. Esto implica que la señal generada durante la fagocitosis puede variar en consecuencia a la coestimulación de estos receptores, modificando el estado de activación del fagocito y la respuesta que se genere.

El que la fagocitosis mediada por la subclase IgG1 sea pobre no implica un desperdicio para el organismo. Tal vez otros tipos celulares son capaces de fagocitar partículas opsonizadas con inmunoglobulinas de la subclase IgG1 eficientemente; o bien, pueden existir condiciones que nosotros no analizamos en donde la fagocitosis mediada por la subclase IgG1 sea tan eficiente como la de cualquier otra subclase. Otra opción puede ser que esa sea la respuesta normal. Se sabe que la producción de cada subclase está asociada a un tipo de respuesta de los linfocitos T ayudadores (linfocitos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Th) que se genera en respuesta al ataque de un patógeno en particular<sup>2</sup>. Consideramos que el macrófago tiene la capacidad para distinguir entre distintos patógenos y con ello se dirige la respuesta hacia la destrucción de un patógeno en particular. La forma en como distingue al patógeno se da a través del tipo de receptor FcγR que es agregado y la forma en como interacciona con las vías generadas por otros tipos de receptores FcγR. Las características de estos agregados regularán la respuesta. Por esto, la activación del macrófago a través de la estimulación de los FcγR, por las distintas inmunoglobulinas producidas durante la respuesta inmune adaptativa, no sólo mejora la capacidad fagocítica y bactericida de la célula, sino que dirige la respuesta a la generación de mecanismos inmunes particulares.

TEMAS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONCLUSIONES

- El tratamiento con PMA incrementa la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con ambos anticuerpos. El tratamiento con PMA incrementa la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG1 a valores similares a los obtenidos con eritrocitos opsonizados con IgG2b. El vehículo no tiene efecto sobre la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con ambos anticuerpos; ni modifica la fagocitosis de eritrocitos sensibilizados. El tratamiento con PMA o bien con vehículo no disminuye la viabilidad celular.
- No se observan diferencias en el estado de fosforilación de Syk en respuesta a los distintos estímulos. El máximo de fosforilación se observa a los 3 min de activación. Sin embargo, el estado de fosforilación de Syk en células estimuladas con eritrocitos opsonizados con la subclase IgG1 muestra un desplazamiento temporal menos abrupto que el observado en células estimuladas con eritrocitos opsonizados con la subclase IgG2b.
- La actividad máxima de la cinasa Syk se observa a los 5 min cuando las células son estimuladas con eritrocitos opsonizados con el anticuerpo de la subclase IgG1, mientras que la actividad máxima de cinasa se observa al minuto de estimulación cuando este se da con eritrocitos opsonizados con el anticuerpo de la subclase IgG2b.
- La fagocitosis mediada por el anticuerpo de la subclase IgG1 es menos sensible al efecto del pervanadato que la mediada por la subclase IgG2b.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- En células no estimuladas se observa la asociación constitutiva entre la cinasa Syk y la fosfatasa SHP. Esta asociación no se modifica cuando las células son incubadas con eritrocitos no opsonizados. Pero esta asociación sí se modifica cuando las células son estimuladas con eritrocitos opsonizados. Se observa que la cantidad y el tiempo por el cual se mantiene asociada SHP a Syk en células estimuladas con IgG1 es mayor que cuando las células son estimuladas con IgG2b.

TEXIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Klein J, Hořejší V. 1997. *Immunology*. Ed. Blackwell Science. 722 p.
2. Paul WE. 1999. *Fundamental Immunology*. 4a edición. Raven Press. New York. 1 p.
3. Rosenberg HF, Gallin J. 1999. Inflammation. En *Fundamental Immunology*. Editado por W. Paul. Raven Press. New York. 1051 p.
4. Van Furth R, Diesselhoff-den D, Raeburn JA, van Zwet TL, Crofton R, van Oud AAB. 1980. Characteristics, origin and kinetics of human and murine mononuclear phagocytes. En *Mononuclear phagocytes. Functional aspects*. Editada por R van Furth. Ed Martinus Nijhoff. London. 45 p.
5. Van Furth R, Sluiter W. 1986. Distribution of blood monocytes between a marginating and a circulating pool. *J. Exp. Med.* 163: 474
6. Van Furth R. 1989. Origin and turnover of monocytes and macrophages. *Curr. Top. Pathol.* 79: 125
7. Auger MJ, Ross JA. 1992. The biology of the macrophage. En *The Macrophage*, Editada por Lewis CE. Y McGee J.O'D. Ed. IRL Press. USA. 20 p.
8. Jones SM, Lindberg, Brown E. 1999. Phagocytosis. En *Fundamental Immunology*. Editado por W. Paul. Raven Press. New York. 997 p.
9. Scott K, Oppenheim D, Oppenheim J. 1993. Proinflammatory cytokines and immunity. En *Fundamental Immunology*. Editado por W. Paul. Raven Press. New York. 485 p.
10. Vilcek J. 1998. The cytokines: An Overview. En *The Cytokine Handbook*. Editado por Thomson A. Academic Press. London. 120 p.
11. Krakauer T, Vilcek J, Oppenheim JJ. 1999. Proinflammatory cytokines: TNF and IL-1 families, chemokines, TGF- $\beta$ , and others. En *Fundamental Immunology*. Editado por W. Paul. Raven Press. New York. 775 p.
12. Soto C. 1999. Factores de crecimiento hematopoyético y transducción de señales. En *Las citocinas en la hematopoyesis y el sistema inmunológico*. Editado por Soto I, Cáceres JR, Mendoza JR, Weiss BS. 1999. Plaza y Valdés. México. 100 p.
13. Lay WH, Nussenzweig V. 1968. Receptors for complement on leucocytes. *J. Exp. Med.* 128: 991
14. Berken A, Benacerref B. 1966. Properties of antibodies cytophilic for macrophages. *J. Exp. Med.* 123: 119
15. Brown EJ. 1995. Phagocytosis *Bioessays*. 17: 109
16. Aderem A, Underhill DM. 1999. Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 593-623
17. Sánchez-Mejorada G, Rosales C. 1998. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J. Leukoc. Biol.* 63: 521
18. Carayannopoulos L, Capra JD. 1993. Immunoglobulins: structure and function. En *Fundamental Immunology* Editado por W. Paul. Raven Press. New York. 110 p.
19. Frazer JK, Capra JD. 1999. Immunoglobulins: Structure and function. En *Fundamental Immunology*. Editado por W. Paul. Raven Press. New York. 37 p.
20. Chan LM, Cathou RE. 1977. The role of the inter-heavy chain disulfide bond in modulating the flexibility of immunoglobulin G antibody. *J. Mol. Biol.* 112: 653
21. Kim H, Matsunaga C, Yoshino A, Kato K, Arata Y. 1994. Dynamical structure of the hinge region of immunoglobulin G as studied by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 236: 300
22. Dangl JL, Wensel TG, Morrison SL, Stryer L, Herzenberg LA, Oi VT. 1988. Segmental flexibility and complement fixation of genetically engineered chimeric human, rabbit and mouse antibodies. *EMBO J.* 7: 1989

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

23. Dudich E, Nezlin RS, Franek F. 1978. Fluorescence polarization analysis of various immunoglobulins. Dependence of rotational relaxation time on protein concentration and on ability to precipitate with antigen. *FEBS Lett.* 89: 89
24. Harris LJ, Skaletsky E, McPherson A. 1998. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *J. Mol. Biol.* 275: 861
25. Harris LJ, Larson SB, Hasel KW, McPherson A. 1997. Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry.* 36: 1581
26. Adetugbo K. 1978. Evolution of immunoglobulin subclasses. Primary structure of a murine myeloma gamma1 chain. *J. Biol. Chem.* 253: 6076
27. Keegan AD, William EP. 1992. Multichain Immune Recognition Receptors: similarities structure and signaling pathways. *Immunol. Today.* 13: 63
28. Reth M. 1989. Antigen receptor tail clue. *Nature.* 338: 383
29. Park JG, Murray R, Chien P, Darby C, Schreiber A. 1993. Conserved cytoplasmic tyrosine residues of the gamma subunit are required for a phagocytic signal mediated by Fc gamma RIIIA. *J. Clin. Invest.* 92: 2073
30. Mitchell MA, Huang Mm, Chien P, Indik ZK, Pan XQ, Schreiber AD. 1994. Substitution and deletions in the cytoplasmic domain of the phagocytic receptor Fc gamma RIIIA: effect on receptor tyrosine phosphorylation and phagocytosis. *Blood.* 84: 1753
31. Santana C, Norris G, Espinoza B, Ortega E. 1996. Protein tyrosine phosphorylation in leukocyte activation through receptors for IgG. *J. Leukoc. Biol.* 60: 433
32. Einspahr KJ, Abraham RT, Bindstadt BA, Uehara Y, Liebson PJ. 1991. Tyrosine Phosphorylation Provides an Early and Requisite Signal for the Activation of Natural Killer Cell Cytotoxic Function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 6279
33. Ortega E. 1995. How do multichain immune recognition receptors signal? A structural hypothesis. *Mol. Immunol.* 32: 941
34. Manger B, Weiss A, Imboden J, Laing T, Stobo JD. 1987. The role of protein kinase C in transmembrane signalling by the T cell antigen receptor complex. Effects of stimulation with soluble or immobilized CD3 antibodies. *J. Immunol.* 139: 2755
35. Brunswick M, June CH, Finkelman FD, Mond JJ. 1989. Different patterns of inositol polyphosphate production are seen in B lymphocytes after cross-linking of sIg by anti-Ig antibody or by a multivalent anti-Ig antibody dextran conjugate. *J. Immunol.* 143: 1414
36. Pleiman CM, D' Ambrosio, Cambier JR. 1994. The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction. *Immunol. Today* 15: 393
37. Jeedi-Tehrani M, Chow SC, Ansoategui IJ, Jondal M, Wigzell H. 1992. Potentiation of transmembrane signaling by cross-linking of antibodies against the beta chain of the T cell antigen receptor of Jurkat T cells. *Cell Immunol.* 141: 1
38. Ortega E, Schweitzer-Stenner R, Pech I. 1988. Possible orientational constraints determine secretory signals induced by aggregation of IgE receptors on mast cells. *EMBO J.* 7: 4101
39. Ortega E, Hazan B, Zor U, Pech I. 1989. Mast cell stimulation by monoclonal antibodies specific for the Fc epsilon receptor yields distinct responses of arachidonic acid and leukotriene C4 secretion. *Eur. J. Immunol.* 19: 251
40. Pecht I, Ortega E, Jovin TM. 1991. Rotational dynamics of the Fc epsilon receptor on mast cells monitored by specific monoclonal antibodies and IgE. *Biochemistry.* 30: 3450
41. Ortega E, Lara M, Lee I, Santana C, Martinez AM, Pfeiffer JR, Lee RJ, Wilson BS, Oliver JM. 1999. Lyn dissociation from phosphorylated Fc epsilon RI subunit: a new regulatory step in the Fc epsilon RI signaling cascade revealed by studies of Fc epsilon RI dimer signaling activity. *J. Immunol.* 162: 176
42. Raghavan M, Bjorkman PJ. 1996. Fc receptors and their interactions with immunoglobulins. *Annu Rev. Dev. Cell Biol.* 12: 181
43. Daëron M. 1997. Fc Receptor Biology. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203

44. Unkeless JC, Scigliano E, Freedman VH. 1988. Structure and function on human and murine receptors for IgG. *Annu. Rev. Immunol.* 6: 251
45. Deo YM, Graziano RF, Repp R, van de Winkel JG. 1997. Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc gamma R-directed immunotherapies. *Immunol. Today.* 18: 127
46. Rosales C, Brown EJ. 1993. Neutrophil collaboration in immune response. En *The Natural Immune System: The Neutrophil*. Editado por Wheeler JG y Abramson JS. Oxford University Press. New York. 73 p.
47. Lund J, Pound JD, Jones PT, Duncan AR, Bentley T, Goodall M, Levine BA, Jefferis R, Winter G. 1992. Multiple binding sites on the CH2 domain of IgG for mouse Fc gamma RII. *Mol. Immunol.* 29: 53
48. Koichi K, Sautes -Fridman C, Wakako Y, Kobayashi K, Uchiyama S, Kim H, Enokizono J, galinha A, Kobayashi Y, Fridman WH, Arata Y, Shimada I. 2000. Structural basis of the Interaction between IgG and Fc $\gamma$  Receptors. *J. Mol. Biol.* 295: 213
49. Kato K, Fridman WH, Arata Y, Sautés-Fridman C. 2000. A conformational change in the Fc precludes the binding of two Fc $\gamma$  receptor molecules to one IgG. *Immunol Today.* 21: 310
50. Oi VT, Vuong TM, Hardy R, Reidler J, Dangi J, Herzenberg LA, Stryer L. 1984. Correlation between segmental flexibility and effector function of antibodies. *Nature.* 307: 136
51. Barnes N, Gavin AL, Tan PS, Mottram P, Koentgen F, Hogarth M. 2002. Fc $\gamma$ RI-Deficient mice show multiple alterations to inflammatory and immune responses. *Immunity.* 16: 379
52. Hazenbos WLW, Heijnen I, Meyer D, Hofhuis F, Revardel de Lavalette C, Schmidt RE, Capel PJA, van de Winkel J, Gessner E, van den Berg T, Verbeek JS. 1998. Murine IgG1 complexes trigger immune effector functions predominantly via Fc $\gamma$ RIII (CD16). *J. Immunol.* 161: 3026
53. Colucci F, Turner M, Schweighoffer E, Guy-Grand D, Di Bartolo V, Salcedo M, Tybulewicz VL, Di santo JP. 1999. Redundant role of the Syk protein tyrosine kinase in mouse NK cell differentiation. *J. Immunol.* 163: 1769
54. Brack M, Coffey PJ, Lammers J-WL, Koenderman L. 1998. Analysis of signal transduction pathways regulating cytokine-mediated Fc Receptor activation on human Eosinophils. *J. Immunol.* 161: 6768
55. Greenberg S y Silverstein SC. 1993. Phagocytosis. En *Fundamental Immunology*. Editada por W. Paul. Ed Raven. New York. 995 p.
56. Metchnikoff E. 1905. *Immunity in infective disease*. Cambridge University Press 1p.
57. Rabinovitch M. 1995. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol.* 5: 85
58. Indik Z, Park JG, Hunter S, Schreiber AD. 1995. The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood.* 86: 4389
59. Greenberg S, Burridge K, Silverstein SC. 1990. Colocalization of F-actin and talin during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J. Exp. Med.* 172: 1853
60. Zigmond SH, Hirsch JG. 1972. Effects cytochalasin B on polymorphonuclear leukocyte locomotion, phagocytosis and glycolysis. *Exp. Cell Res.* 73: 383
61. Greenberg S. 1995. Signal transduction of phagocytosis. *Trends Cell Biol.* 5: 93
62. Kwiatkowska K, Sobota A. 1999. Signaling pathways in phagocytosis. *BioEssays.* 21: 422
63. Allen L-AH, Aderem A. 1995. A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *J. Exp. Med.* 182: 829
64. Allen L-AH, Aderem A. 1995. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.* 184: 627
65. Superti-Furga G, Courtneidge SA. 1995. Structure-function relationships in Src family and related protein tyrosine kinases. *BioEssays.* 17: 321

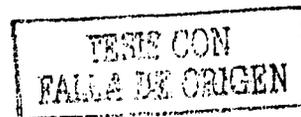
TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

66. Hamada F, Aoki M, Akiyama T, Toyoshima K. 1993. Association of immunoglobulin G Fc receptor II with Src-like protein-tyrosine kinase Fgr in neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 6305
67. Piganata C, Prasad KV, Robertson MJ, Levine H, Rudd CE, Ritz J. 1993. Fc $\gamma$ RIIIA-mediated signal involves src-family lck in human natural killer cells. *J. Immunol.* 151: 6794
68. Germano P, Gomez J, Kazanietz MG, Blumberg PM, Rivera J. 1994. Phosphorylation of the gamma chain of the high affinity receptor for immunoglobulin E by receptor-associated protein kinase C-delta. *J. Biol. Chem.* 269: 23102
69. Ghazizadeh S, Bolen JB, Fleit HB. 1994. Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc $\gamma$ RII in monocytic THP-1 cells. *J. Biol. Chem.* 269: 8878
70. Durden DL, Kim HM, Calore B, Liu Y. 1995. The Fc $\gamma$ RI receptor signals through the activation of hck and MAP kinase. *J. Immunol.* 154: 4039
71. Korade-Mirnicis Z, Corey SJ. 2000. Src kinases-mediated signaling in leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* 68: 603
72. Strzelecka A, Kwiatkowska K, Sobota A. 1997. Tyrosine phosphorylation and Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis. *FEBS Lett.* 400: 11
73. Garcia-García E, Rosales C. 2002. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* 72: 1092
74. Fitzer-Attas CJ, Lowry M, Crowley MT, Finn AJ, Meng F, DeFranco AL, Lowell CA. 2000. Fc $\gamma$  receptor mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Lck, Fgr and Lyn. *J. Exp. Med.* 191: 669
75. Gresham B, Dale B, Potter JW, Chang PW, Vines CM, Lowell CA, Lagenaur CF, Willman CL. 2000. Negative regulation of phagocytosis in murine macrophages by the Src kinase family member, Fgr. *J. Exp. Med.* 191: 515
76. Fukamachi H, Takei M, Kawakami T. 1993. Activation of multiple protein kinases including a MAP Kinase upon Fc $\gamma$ RI cross-linking. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 102: 15
77. Durden DL, Liu YB. 1994. Protein-tyrosine kinase p72syk in Fc $\gamma$ RI receptor signaling. *Blood.* 84: 2102
78. Ghazizadeh S, Bolen JB, Fleit HB. 1995. Tyrosine phosphorylation and association of Syk with Fc $\gamma$ RII in monocytic THP-1 cells. *Biochem J.* 305: 669
79. Zeilmann L, Knorr T, Knoll M, Romeo C, Sirim P, Kolanus W. 1998. T cell activation induced by novel gain-of-function mutants of Zyk and ZAP-70. *J. Biol. Chem.* 273: 15445
80. Turner M, Schweighoffer E, Colucci F, Di Santo J, Tybulewicz V. 2000. Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol. Today.* 21: 148
81. Strzelecka A, Pyrzynska B, Kwiatkowska K, Sobota A. 1997. A Syk kinase tyrosine-phosphorylated proteins and actin filaments accumulate at forming phagosomes during Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis. *Cell Motil Cytoskeleton.* 38: 287
82. Strzelecka A, Kwiatkowska K, Sobota A. 2002. Lyn and Syk kinases are sequentially engaged in phagocytosis mediated by Fc $\gamma$ R. *J. Immunol.* 169: 6787
83. Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi N, Latour S, Cheng A, Veillette A, Grinstein S, Pacuson T. 1998. The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc $\gamma$  receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol. Cell. Biol.* 18: 4209
84. Kim MK, Pan XQ, Iluang ZY, Ilunter S, Ilwang PLI, Indik ZK, Schreiber AD. 2001. Fc $\gamma$  receptors differ in their structural requirements for interactions with the tyrosine kinase Syk in the initial steps of signaling for phagocytosis. *Clinical Immunol.* 98:125
85. Toker A, Cantley LC. 1997. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH Kinase. *Nature.* 387: 673
86. Kapeller R, Cantley LC. 1994. Phosphatidylinositol 3-kinase. *Bioessays.* 16: 565

87. Klarlund JK, Guilherme A, Holik JJ, Virbasius JV, Chawla A, Czech MP. 1997. Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains. *Science*. 275: 1927
88. Hunter T. 1995. When Is a Lipid Kinase Not a Lipid Kinase? When It Is a Protein Kinase. *Cell*. 83: 1
89. Panaretou C, Domin J, Cockcroft S, Waterfield MD. 1997. Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-Kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150-PtdIns 3-kinase complex. *J. Biol. Chem.* 272: 2477
90. Schu PV, Takegawa K, Fry MJ, Stack JH, Waterfield MD, Emr SD. 1993. Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science*. 260: 88
91. Vanhaesebroeck B, Waterfield D. 1999. Signaling by distinct classes of Phosphoinositide 3-Kinases. *Exp. Cell. Res.* 253: 239
92. Wymann M, Pirola L. 1998. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1436: 127
93. Viera OV, Botelho RJ, Rameh L, Brachmann SM, Matsuo T, Davidson HW, Schreiber A, Backer JM, Cantley LC, Grinstein S. 2001. Distinct roles of class I and III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J. Cell Biol.* 155: 19
94. Cox D, Tseng C-C, Gordana B, Greenberg S. 1999. A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J. Biol. Chem.* 274: 1240
95. Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Downward J. 1996. Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO J.* 15: 2442
96. Flanagan CA, Schnieders EA, Emerick AW, Kunisawa R, Admon A, Thorner J. 1993. Phosphatidylinositol 4-kinase: gene structure and requirement for yeast cell viability. *Science*. 262: 1444
97. Domin J, Waterfield MD. 1997. Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members. *FEBS Lett.* 410: 91
98. Dhand R, Hiles I, Panayotou G, Roche S, Fry MJ, Gout I, Totty NF, Truong O, Vicendo P, Yonezawa K. 1994. PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *EMBO J.* 13: 522
99. Melendez AJ, Gillooly DJ, Harnett MM, Allen JM. 1998. Aggregation of the human high affinity immunoglobulin G receptor (FcγRI) activates both tyrosine kinase and G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 2169
100. Didichenko SA, Tilton B, Hemmings BA, Ballmer-Hofer K, Thelen M. 1996. Constitutive activation of protein kinase B and phosphorylation of p47phox by a membrane-targeted phosphoinositide 3-kinase. *Curr Biol.* 6: 1271
101. Ninomiya N, Hazeki K, Fukui Y, Seya T, Okada T, Hasezi O, Ui M. 1994. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 269: 22732
102. Araki N, Johnson MT, Swanson JA. 1996. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J. Cell Biol.* 135: 1249
103. Lennartz MR, Yuen AFC, McKenzie-Masi S, Russell DG, Buttle KF, Smith JJ. 1997. Phospholipase A<sub>2</sub> inhibition results in sequestration of plasma membrane into electron lucent vesicles during IgG-mediated phagocytosis. *J. Cell. Sci.* 110: 2041
104. Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD. 2001. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 535

TOME CON  
 FALLA DE ORIGEN

105. Cox D, Berg JS, Cammer M, Chingwundoh JO, Dale BM, Cheney RE, Greenberg S. 2002. Myosin X is a downstream effector of PI(3)K during phagocytosis. *Nat. Cell Biol.* 4: 469
106. Marshall CJ. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signalling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell.* 80: 179
107. Zhang C, Beaven M. 1999. The MAP Kinases and their role in mast cell and basophils. En *Signal Transduction in Mast Cells and Basophils*. Editado Razin E, Rivera J. Ed. Springer. New York 247 p.
108. Jiang Y, Zhuangjie Li, Edward M. Schwarz, Anning Lin, Kunliang Guan, Richard J. Ulevitch, and Jiahuai Han. 1997. Structure-function studies of p38 mitogen-activated protein kinase. Loop 12 influences substrate specificity and autophosphorylation, but not upstream kinase selection. *J. Biol. Chem.* 272: 11096
109. Coxon PY, Rane MJ, Pwell DW, Klein JB, McLeish Kenneth R. 2000. Differential Mitogen-Activated Protein Kinase Stimulation by Fc $\gamma$  Receptor IIa and Fc $\gamma$  Receptor IIIb determines the activation phenotype of human neutrophils. *J. Immunol.* 164: 6530
110. Grammer TC, Blenis J. 1997. Evidence of MEK-independent pathways regulating the prolonged activation of the ERK-MAP kinases. *Oncogene.* 14: 1635
111. Sanchez-Mejorada G, Rosales C. 1998. Fc $\gamma$  Receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in monocytes is independent of Ras. *J. Biol. Chem.* 273: 27610
112. Wilson NJ, Jaworowski A, Ward AC, Hamilton JA. 1998. cAMP enhances CSF-1-induced ERK activity and c-fos mRNA expression via a MEK-dependent and Ras-independent mechanism in macrophages. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 244: 475
113. Ahn NG, Campbell JS, Seger R, Jensen AM, Graves LM, Krebs EG. 1993. Metabolic labelling of MAP kinase kinase in A431 cells demonstrates phosphorylation on serine and treonine residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5143
114. Haysted TA, Dent P, Wu J, Haysted CM, Sturgill TW. 1992. Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase. *FEBS Lett.* 13: 17
115. McLeish KR, Klein JB, Coxon PY, Head KZ, Ward RA. 1998. Bacterial phagocytosis activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen activated protein kinase cascades in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 64: 835
116. Suchard SJ, Mansfield PJ, Boxer LA, Shayman JA. 1997. Mitogen-activated protein kinase activation during IgG-dependent phagocytosis in human neutrophils: inhibition by ceramide. *J. Immunol.* 158: 4961
117. Rose DM, Winston BW, Chan ED, Riches CWH, Gerwins P, Johnson GL, Henson PM. 1997. Fc $\gamma$  receptor cross linking activates p42, p38, and JNK/SAPK mitogen-activated protein kinase in murine macrophages. Role for p42MAPK in Fc $\gamma$  receptor-stimulated TNF- $\alpha$  synthesis. *J. Immunol.* 158: 3433
118. Seger R, Krebs E. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9: 726
119. Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. 1993. cPLA $_2$  is phosphorylated and activated by MAP kinases. *Cell.* 72: 269
120. Lennartz MR, Brown EJ. 1991. Arachidonic acid is essential for IgG Fc receptor-mediated phagocytosis by human monocytes. *J. Immunol.* 147: 621
121. Lennartz MR. 1999. Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid derived second messengers in phagocytosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31: 415
122. Suchard SJ, Hinkovska-Galcheva V, Mansfield PJ, Boxer LA, Shayman JA. 1997. Ceramide inhibits IgG-dependent phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood.* 89: 2139
123. Raeder EM, Mansfield PJ, Hinkovska-Galcheva V, Shayman JA, Boxer LA. 1999. Syk activation initiates downstream signaling events during human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis. *J. Immunol.* 163: 6785



124. Mansfield PJ, Shayman JA, Boxer LA. 2000. Regulation of polymorphonuclear leukocyte phagocytosis by myosin light chain kinase after activation of mitogen-activated protein kinase. *Blood*. 95: 2407
125. House C, Kemp BE. 1987. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototype in its regulatory domain. *Science*. 238: 1726
126. Hurley JH, Newton AC, Parker PJ, Blumberg PM, Nishizuka Y. 1997. Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci*. 6: 477
127. Kaibuchi K, Fukumoto Y, Oku N, Takai Y, Arai KI, Maramatsu M. 1989. Molecular genetic analysis of the regulatory and catalytic domains of protein kinase C. *J. Biol. Chem*. 264: 13489
128. Shao X, Davletov BA, Sutton RB, Sudhof TC, Rizo J. 1996. Bipartite Ca<sup>2+</sup>-binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C. *Science*. 273: 248
129. Mochly-Rosen D. 1995. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science*. 268: 247
130. Ron D, Luo J, Mochly-Rosen D. 1995. C2 Region-derived peptides inhibit translocation and function of  $\beta$  Protein Kinase C *in Vivo*. *J. Biol. Chem*. 270: 24180
131. Kiley S, Parker PJ. 1995. Differential localization of protein kinase C isozymes in U937 cells: evidence for distinct isozyme functions during monocyte differentiation. *J. Cell Sci*. 108: 1003
132. Takai Y, Kishimoto A, Iwasa Y, Kawahara Y, Mori T, Nishizuka Y. 1979. Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem*. 254: 3692
133. Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y. 1988. The structure, expression, and properties of additional members of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem*. 263: 6927
134. Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y. 1989. Protein kinase C zeta subspecies from rat brain: its structure, expression, and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 3099
135. Zheleznyak A, Brown E.J. 1992. Immunoglobulin-mediated phagocytosis by human monocytes requires Protein Kinase C activation. *J. Biol. Chem*. 267: 12042
136. Larsen EC, DiGennaro JA, Saito N, Mehta S, Loegering DJ, Mazurkiewicz JE, Lennartz MR. 2000. Differential requirement for classic and novel PKC isoforms in respiratory bursts and phagocytosis in RAW 264.7 cells. *J. Immunol*. 165: 2809
137. Zheng L, Zomerdijk TPL, Aarnoudse C, van Furth R, Nibbering PH. 1995. Role of protein kinase C isozymes in Fc $\gamma$  receptor-mediated intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by human monocytes. *J. Immunol*. 155: 776
138. Kant A, De P, Peng X, Yi T, Rawlings D, Suk-Kim J, Durden D. 2002. SHP-1 regulates Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis and the activation of RAC. *Blood*. 100: 1852
139. Tonks N, Neel BG. 2001. Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr. Opin. Cell Biol*. 13: 182
140. Thien CBF, Langdon WY. 2001. CBL: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*. 2: 294
141. Rao N, Dodge I, Band H. 2002. The Cbl family of ubiquitin ligases: critical negative regulators of tyrosine kinase signaling in immune system. *J. Leukoc. Biol*. 71: 753
142. Hazeki K, Hazeki O, Matsuo T, Seya T, Yamashita T, Nagasawa S, Band H, Ui M. 1999. Role of Syk in Fc $\gamma$  receptor-coupled tyrosine phosphorylation of Cbl in a manner susceptible to inhibition by protein kinase C. *Eur. J. Immunol*. 29: 3302
143. Garay CA. 1994. Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales murinos de la clase IgG, específicos para el 2,4-dinitrofenol. Tesis Licenciatura. Facultad Química, UNAM, México.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

144. Garay CA. 2002. Influencia de la subclase de IgG para mediar fagocitosis en macrófagos murinos. Tesis Maestría. Facultad Química. UNAM. México.
145. Santoyo P. 2002. Estudio de las vías bioquímicas implicadas en la transducción de señales mediada por los receptores Fc $\gamma$ R. Tesis Licenciatura. Facultad Ciencias. UNAM. México.
146. GIBCO BRL. 1992. Catalogue and reference Guide, 11, 82.
147. Eisen HN. 1964. Some methods applicable to study of experimental hypersensitivity. *Meth. Med. Res.* 10: 77
148. Jungi T. 1985. A rapid and sensitive method allowing photometric determination of erythrophagocytosis by mononuclear phagocytes. *J. Immunol. Methods.* 82: 141
149. Lesoume R, Bruhns P, Fridman WH, Daéron M. 2001. Insufficient phosphorylation prevents Fc $\gamma$ RIIB from recruiting the SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Biol. Chem.* 276: 6327
150. Hansen MB, Nilsen SE, Berg K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods.* 119: 203
151. Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. 1990. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J. Immunol. Methods* 131: 165
152. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65: 55
153. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M. 1993. An improved MTT assay. *J. Immunol. Methods.* 157: 203
154. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680
155. Budworth J, Gescher A. 1995. Differential inhibition of cytosolic and membrane-derived PKC activity by staurosporine and other kinase inhibitors. *FEBS Lett.* 362: 139
156. Chen B-C, Chou C-F, Lin W-W. 1998. Pyrimidinoceptor-mediated potentiation of inducible nitric-oxide synthase induction in J774 macrophages. *J. Biol. Chem.* 273: 29754
157. Davis PD, Hill CH, Keech E, Lawton G, Nixon JS, Sedgwick AD, Wadsworth J, Westmacott D, Wilkinson SE. 1989. Potent selective inhibitors of protein kinase C. *FEBS Lett.* 259: 61
158. Dieter P, Fitzke E. 1991. Ro 31-8220 and Ro 31-7549 show improved selectivity for protein kinase C over Staurosporine in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 396
159. Trachsel S. & Kelller HU. 1995. Selective responses (actin polymerizaion, shape changes, locomotion, pinocytosis) to the PKC inhibitor Ro 31-8220 suggest that PKC discriminately regulates functions of human blood lymphocytes. *J. Leuk. Biol.* 57: 587
160. Wilkinson SE, Parker PJ, Nixon JS. 1993. Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *Biochem. J.* 294: 335
161. Karimi K, Gemmill TR, Lennartz MR. 1999. protein Kinase C and calcium-independent phospholipase are required for de IgG-mediated phagocytosis by Mono-Mac-6 cells. *J. Leukoc. Biol.* 65: 854
162. Breton A, Descoteaux A. 2000. Protein Kinase C- $\alpha$  participates in Fc $\gamma$ R-mediated fagocytosis in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276: 472
163. Bit RA, Davies PD, Elliot LH, Harris W, Hill CH, Keech E, Kumar MKH, Lawton G, Maw A, Nixon JS, Vesey DR, Wadsworth J, Wilkinson SE. 1993. Inhibitors of protein kinase C. 3. Potent and highly selective bisindolylmaleimides by conformational restriction. *J. Med. Chem.* 36: 21
164. Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marme D, Schachtele C. 1993. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J. Biol. Chem.* 268: 9194

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

165. Kiss Z, Phillips H, Anderson WH. 1995. The bisindolylmaleimide GF 109203X, a selective inhibitor of protein kinase C, does not inhibit the potentiating effect of phorbol ester on ethanol-induced phospholipase C-mediated hydrolysis of phosphatidylethanolamine. *Biochem. Biophys. Acta.* 1265: 93
166. Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, Duhamel L, Charon D, Kirilovsky J. 1991. The Bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.* 266: 15771
167. Ron D, Kazanietz MG. 1999. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.* 13: 1658
168. Darby C, Geahlen RL, Schreiber AD. 1994. Stimulation of macrophage Fc $\gamma$ RIIIA activates the receptor-associated protein tyrosine kinase Syk and induces phosphorylation of multiple proteins including p95Vav and p62/GAP-associated protein. *J. Immunol.* 152: 5429
169. Greenberg S. 1999. Modular components of phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* 66: 712
170. Indik Z, Park JG, Pan X, Schreiber AD. 1995. Induction of phagocytosis by a protein tyrosine kinase. *Blood.* 85: 1175
171. Majeed M, Cavegion E, Lowell CA, Berton G. 2001. Role of the Src kinases and Syk in Fc $\gamma$ -mediated phagocytosis and phagosome-lysosome fusion. *J. Leukoc. Biol.* 70: 801
172. Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, Tybulewicz SLJ, De Franco AL. 1997. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis by Fc $\gamma$  receptors on macrophages. *J. Exp. Med.* 186: 1027
173. Furlong MT, Mahrenholz AM, Kim Ki-Han, Ashendel CL, Harrison ML. 1997. Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk. *Biochim. Biophys. Acta.* 1355: 177
174. Law CL, Chandran KA, Sidorenko SP, Clark EA. 1996. Phospholipase C-gamma1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol. Cell. Biol.* 16: 1305
175. Sillman AL, Monroe JG. 1995. Association of p72 Syk with the SRC homology -2 (SH2) domains of PLC- $\gamma$ 1 in B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 270: 11806
176. D'Ambrosio D, Fong DC, Cambier JC. 1996. The SHIP phosphatase becomes associated with Fc gamma RIIB1 and is tyrosine phosphorylated during "negative" signaling. *Immunol. Lett.* 54: 77
177. Sarmay G, Koncz G, Pecht I, Gergely J. 1997. Fc gamma receptor type IIb induced recruitment of inositol and protein phosphatases to the signal transducing complex of human B-cell. *Immunol. Lett.* 57: 159
178. Mikalsen SO, Kaalhus O. 1998. Properties of pervanadate and permolybdate. *J. Biol. Chem.* 273: 10036
179. Clynes R, Maizes JS, Guinamard R, Ono M, Takai T, Ravetch JV. 1999. Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *J. Exp. Med.* 189: 179
180. Dustin LB, Plas DR, Wong J, Hu YT, Soto C, Chan AC, Thomas ML. 1999. Expression of dominant-negative src-homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 results in increased Syk tyrosine kinase activity and B cell activation. *J. Immunol.* 162: 2717
181. Magor BG, Magor KE. 2001. Evolution of effectors and receptors of innate immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 651
182. Radaev S, Sun P. 2001. Recognition of immunoglobulins by Fc $\gamma$  receptors. *Mol. Immunol.* 38: 1073
183. Karimi K, Lennartz MR. 1995. Protein kinase C activation precedes arachidonic acid release during IgG-mediated phagocytosis. *J. Immunol.* 155: 5786

184. Melendez AJ, Harnett MM, Allen JM. 1999. Differentiation-dependent switch in protein kinase C isoenzyme activation by Fc $\gamma$ RI, the human high-affinity receptor for immunoglobulin G. *Immunology*. 96: 457
185. Lui YC, Liu Y, Elly C, Yoshida H, Lipkowitz S, Altman A. 1997. Serine phosphorylation of Cbl induce by phorbol ester enhances its association with 14-3-3 proteins in T cell via a novel serine-rich 14-3-3-binding motif. *J. Biol. Chem.* 272: 9979
186. Hunter S, Sato N, Kim MK, Huang ZY, Chu DH, Park JG, Schreiber AD. 1999. Structural requirements of Syk kinase for Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis. *Exp. Hematol.* 27: 875
187. Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi N, Latour S, Cheng A, Veillette A, Grinstein S, Pawson T. 1998. The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc $\gamma$  receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol. Cell Biol.* 18: 4209
188. Louvin MH, Adamczewski M, Numerof R, Letourneur O, Vallé A, Kinet J-P. 1994. Differential control of the tyrosine kinases Lyn and Syk by the two signaling chains of the high affinity immunoglobulin E receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 5918
189. Kwiatkowska K, Sobota A. 2001. The clustered Fc $\gamma$  receptor II is recruited to Lyn-containing membrane domains and undergoes phosphorylation in a cholesterol-dependent manner. *Eur. J. Immunol.* 31: 989
190. Park JG, Schreiber A. 1995. Determinants of the phagocytic signals mediated by type IIIA Fc $\gamma$  receptor, Fc $\gamma$ RIIIA: Sequence requirements and interaction with protein-tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 7381
191. Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Leichter RJ, Neel B, Birge R, Fajardo J, Chou M, Hanafusa H, Schaffhausen B. 1993. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell.* 72: 767
192. Van den Herik-Oudijk IE, Bekke T, Tempelman MJ, Capel PJA, Van de Winkel JGJ. 1995. Functional differences between two Fc Receptor ITAM signaling motifs. *Blood.* 86:3302
193. Sato N, Kim MK, Schreiber AD. 1999. Enhancement of Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis by transforming mutants of Cbl. *J. Immunol.* 163: 6123
194. Ujike A, Ishikawa Y, Ono M, Yuasa T, Yoshino T, Fukumoto M, Ravetch J, Takai T. 1999. Modulation of immunoglobulin (Ig)E-mediated systemic anaphylaxis by low-affinity Fc receptors for IgG. *J. Exp. Med.* 189: 1573
195. Bourguignon LYW, Bourguignon GJ. 1984. Capping and the cytoskeleton. *Int. Rev. Cytology.* 87: 195
196. Bourguignon LYW, Singer SJ. 1977. Transmembrane interactions and the mechanisms of capping of surface receptors by their specific ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5031
197. Kwiatkowska K, Sobota A. 1999. Tyrosine phosphorylation/dephosphorylation controls capping of Fc $\gamma$  Receptor II in U937 cells. *Cell. Motility Cytoskel.* 42:298
198. Lai L, Alaverdi N, Matais L, Morse III H. 1998. Mouse cell surface antigen: Nomenclature and Immunophenotyping. *J. Immunol.* 160: 3861

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN