



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

Transducción de señales del receptor  
Fc $\gamma$ RIIIB

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

MARCO ANTONIO HERNÁNDEZ LUNA



MÉXICO D.F.

AÑO 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## ALQUIMIA DEL DOLOR

Éste te abrasa con su ardor,  
Aquél, Natura, en ti se duele.  
Lo que a uno dice: ¡Sepultura!  
Repite a otro: ¡Esplendor, vida!

Hermes extraño que me asistes  
Y me intimidas a diario,  
Tú en un Midas me transformas,  
El alquimista más triste;

Por ti cambio el oro en hierro,  
Y el infierno en paraíso;  
De las nubes en el sudario  
Descubro un cadáver amado,  
Y en celestes riberas  
Construyo grandes sarcófagos.

Charles Baudelaire

*DEDICATORIA*

*A*

*MIS*

*PADRES*

*y*

*HERMANOS*

## *AGRADECIMIENTOS*

*A mis padres Bernardino y Consuelo, porque sin su apoyo no habría podido realizar este trabajo, ni seguir alcanzando otra de mis metas.*

*A mis Hermanos Hugo y Ari por su apoyo ya que sin ustedes no habría podido terminar y cumplir otra de mis metas.*

*Al Dr. Carlos Rosales Ledezma, por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio y por todo lo que aprendí bajo su tutela.*

*A los miembros del jurado, por su participación.*

*A la M. en IBB Nancy Yorley Mora Pérez por su asesoría técnica en la realización de este trabajo.*

*A mis compañeros y amigos del Laboratorio Melissa, Selma, Erick y Victor por haber tenido la oportunidad de compartir todo este tiempo conmigo.*

*A mis Amigos de la licenciatura, aunque ya casi no nos vemos, pero, después de todo este tiempo siguen siendo mis hermanos de carrera.*

*Por último este párrafo se los dedico a aquellas personas que por algún motivo olvide mencionar, les pido una disculpa, pero aunque sus nombres no aparezcan, también me acuerdo de ustedes (incluyéndolos y K Gracias).*

*Vamos por la tercera meta... pero, no la última*

<b>Índice</b>	<b>Pag.</b>
<b>1. Abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>2. Resumen</b>	<b>3</b>
<b>3. Abstract</b>	<b>5</b>
<b>4. Antecedentes</b>	<b>7</b>
4.1 Generalidades	7
4.2 Receptores Fc $\gamma$ R	8
<b>4.3 Transducción de señales de los receptores Fc</b>	<b>11</b>
<b>4.4 Neutrófilos</b>	<b>14</b>
<b>4.5 Modelos de la vía de señalización del receptor Fc<math>\gamma</math>RIIIB</b>	<b>16</b>
<b>5. Justificación</b>	<b>19</b>
<b>6. Hipótesis</b>	<b>20</b>
<b>7. Objetivos</b>	<b>21</b>
<b>8. Metodología</b>	
<b>8.1 Cultivo celular</b>	<b>22</b>
<b>8.2 Transfección de la línea celular HL-60</b>	<b>22</b>
<b>8.3 Citometría de flujo</b>	<b>22</b>
<b>8.4 Selección de células positivas para el receptor Fc<math>\gamma</math>RIIIB por Sorting</b>	<b>23</b>
<b>8.5 Medición de calcio intracelular</b>	<b>24</b>
<b>8.6 Medición de ERK por Western Blot</b>	<b>25</b>
<b>9 Resultados</b>	<b>26</b>
<b>9.1 Expresión del receptor Fc<math>\gamma</math>RIIIB en células HL-60</b>	<b>29</b>

<b>9.2</b>	<b>Transfección de las células HL-60</b>	<b>29</b>
<b>9.3</b>	<b>Selección restringida de células HL-60 positivas para el receptor Fc<math>\gamma</math>RIIIB</b>	<b>32</b>
<b>9.4</b>	<b>Expresión de los receptores presentes en la línea celular H6<math>\gamma</math>3B</b>	<b>34</b>
<b>9.5</b>	<b>Movilización de calcio intracelular en la línea H6<math>\gamma</math>3B</b>	<b>35</b>
<b>9.6</b>	<b>Movilización de calcio intracelular en células H6<math>\gamma</math>3B diferenciadas, después del entrecruzamiento de los receptores Fc<math>\gamma</math>RIIA y Fc<math>\gamma</math>RIIIB</b>	<b>40</b>
<b>9.7</b>	<b>Medición de p-ERK por Western Blot</b>	<b>47</b>
<b>10.</b>	<b>Discusión</b>	<b>49</b>
<b>11.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>58</b>
<b>12.</b>	<b>Referencias</b>	<b>59</b>

## 1. Abreviaturas

BCR: Receptor del antígeno B

BSA: Albúmina Sérica Bovina

CCDA: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

DAG: Diacil Glicerol

DMSO: Dimetil sulfóxido

DRM: Membranas Resistentes a Detergentes

FcR: Receptores Fc

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

fMLP: formil-Metionil-Leucin-Fenilalanina

GPI: Glicosilfosfatidil inositol

HL-60: Línea celular de origen promielocítica

H6 $\gamma$ 3B: Línea celular transfectada para expresar al receptor Fc $\gamma$ RIIIB de forma estable.

IB4: Anticuerpo monoclonal que reconoce a las integrinas  $\beta_2$

IgG: Inmunoglobulina G

IP<sub>3</sub>: Inositol Trifosfato

ITAM: Inmunoreceptor basado en la activación de motivos de Tirosina

ITIM: Inmunoreceptor basado en la inhibición de Tirosinas

K<sub>d</sub>: Constante de disociación

NK: Células asesinas naturales

PBS: Buffer de fosfatos

pcDNA3: plásmido al que se inserto el cDNA del receptor Fc $\gamma$ RIIIB

pGL3c: Plásmido que codifica para la enzima luciferasa

PIP<sub>2</sub>: Fosfatidil inositol bifosfato



PIP<sub>3</sub>: Fosfatidil inositol trifosfato

PI3K: Fosfatidil inositol 3 Fosfato

PLC $\gamma$ : Fosfolipasa C gamma

SFB: Suero fetal Bovino

TS2/16: Anticuerpo monoclonal que reconoce a las integrinas  $\beta_1$

3G8: Anticuerpo monoclonal que reconoce la región tipo inmunoglobulina del receptor Fc $\gamma$ RIIB.

IV.3: Anticuerpo monoclonal que reconoce la región tipo inmunoglobulina del receptor Fc $\gamma$ RIIA.

## 2. RESUMEN

Los neutrófilos expresan a los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB de manera constitutiva. Estos receptores son activados al reconocer complejos antígeno – anticuerpo a través de sus regiones tipo inmunoglobulina. Las funciones del receptor Fc $\gamma$ RIIA se han descrito en distintas células fagocíticas incluyendo a los neutrófilos. Sin embargo, las funciones del receptor Fc $\gamma$ RIIIB no son completamente comprendidas. El estudio de la vía de señalización del Fc $\gamma$ RIIIB se ha visto obstaculizado por el hecho de que es un receptor exclusivo del neutrófilo, que es una célula de vida media corta. Además, que no existe un método de transfección eficiente para el neutrófilo, que permita realizar experimentos de biología molecular con el fin de aclarar la vía de señalización del Fc $\gamma$ RIIIB. Por este motivo, se expresó al Fc $\gamma$ RIIIB en la línea celular HL-60, la cuál se ha reportado puede ser diferenciada a neutrófilo a través de un tratamiento por 6 días con Dimetil Sulfóxido. Mis resultados muestran que las células HL-60 diferenciadas a neutrófilos no expresan al receptor Fc $\gamma$ RIIIB. Sin embargo, se ha reportado que el aumento en la expresión del receptor Fc $\gamma$ RIIA y de las integrinas  $\beta_1$  y  $\beta_2$  son un indicador de la diferenciación de las células HL-60 a neutrófilos. Las células HL-60 se transfectaron con el plásmido pcDNA3/ Fc $\gamma$ RIIIB para que expresaran al receptor Fc $\gamma$ RIIIB. Las células positivas para el Fc $\gamma$ RIIIB fueron separadas por citometría de flujo, obteniendo a sí, una nueva línea celular la cuál recibió el nombre de H6 $\gamma$ 3B. En esta nueva línea celular se probaron dos funciones que se han reportado para el receptor H6 $\gamma$ 3B Fc $\gamma$ RIIIB: la movilización de calcio intracelular y la activación de la cinasa ERK.

Los resultados obtenidos muestran que las células H6 $\gamma$ 3B diferenciadas a neutrófilos son capaces de activar a la cinasa ERK. Sin embargo, no llevan acabo la movilización de calcio intracelular. La obtención de esta línea celular ayudará a comprender la vía de señalización del receptor Fc $\gamma$ RIIB.

### 3. ABSTRACT

Fc $\gamma$ RIIIB and Fc $\gamma$ RIIA receptors are constitutively expressed in neutrophils. These receptors are activated by immune complex through their immunoglobulin-like domains. The functions of Fc $\gamma$ RIIA have been described in different phagocytic cells including neutrophils. However, the functions of Fc $\gamma$ RIIIB receptor are not completely understood. The signal transduction pathway of the Fc $\gamma$ RIIIB has been obstructed because of it is an exclusive receptor in neutrophils, which are short-lived cells. In addition, there are currently not available methods for neutrophil transfection that allows to accomplish experiments of molecular biology with the purpose to clarify the signal transduction pathway of the Fc $\gamma$ RIIIB. Therefore, we expressed Fc $\gamma$ RIIIB in cell line HL-60, which has been reported can be differentiated to neutrophils through treatment by 6 days with Dimethyl Sulfoxide. My results showed that differentiated HL-60 cell to neutrophil does not express Fc $\gamma$ RIIIB receptor. However, it has been reported that enhance in the expression of Fc $\gamma$ RIIA receptor and integrins  $\beta_1$  y  $\beta_2$  is an indicator of differentiation of HL-60 cell to neutrophil. HL-60 cell was transfected with plasmid pcDNA3/Fc $\gamma$ RIIIB so that it expressed Fc $\gamma$ RIIIB receptor. The positive cells for the Fc $\gamma$ RIIIB were separated by flow cytometry. We obtained a new cell line which received the name of H6 $\gamma$ 3B. In this new cell line we studied two functions that have been reported by the fcgriiib: the intracellular calcium flow and the activation of kinase ERK.

The results obtained in this work showed that differentiated cells H6 $\gamma$ 3B to neutrophils are able to activated ERK. Nevertheless, they did not enhance the level

of intracellular calcium by the cross-linking of Fc $\gamma$ RIIIB. This new cell line will help to understand signal transduction pathway of the Fc $\gamma$ RIIIB.

## **4. Antecedentes**

### **4.1 Generalidades**

En la naturaleza existe una gran variedad de receptores expresados sobre la superficie de los distintos tipos celulares. La unión de una molécula señalizadora a su receptor específico desencadena una serie de reacciones bioquímicas en el interior de las células cuyo resultado final es un cambio en la actividad metabólica de las células. Este proceso es conocido como transducción de señales.

En bacterias y otros organismos unicelulares, los procesos de transducción de señales permiten a las células responder a las influencias del medio ambiente que les rodea. En organismos pluricelulares el proceso de transducción de señales puede ser iniciado por una gran cantidad de estímulos como: neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento.

Algunas de las respuestas ocasionadas por la unión de una molécula a su receptor incluyen: la regulación de la expresión genética, la regulación de alguna vía metabólica y la fagocitosis.

La fagocitosis es un mecanismo de defensa del huésped que consiste en la captación y destrucción de microorganismos patógenos infecciosos. En el sistema inmunológico, existe un conjunto de células especializadas conocidas como fagocitos, que ingieren rápida y eficientemente a microorganismos invasores en sitios de inflamación. Dentro de las principales células fagocíticas se encuentran los neutrófilos y los macrófagos [1].

La fagocitosis es iniciada por la interacción de opsoninas (sustancias del cuerpo que recubren al microorganismo) con receptores específicos presentes en la superficie de células fagocíticas. Entre los receptores fagocíticos se encuentran los receptores Fc (FcR) que reconocen la fracción cristalina (Fc) de las inmunoglobulinas (anticuerpos) y los receptores de complemento [2].

Los receptores involucrados en la fagocitosis mejor estudiados son los FcR. Estos receptores se expresan en muchos tipos de células hematopoyéticas. Los receptores que unen IgG se denominan Fc $\gamma$ R, los que unen IgA son Fc $\alpha$ R y los que se unen a IgE son Fc $\epsilon$ R. Todos ellos pertenecen a la familia de genes de las superinmunoglobulinas [3]. Los receptores mejor caracterizados corresponden a la clase de IgG (Fc $\gamma$ R). Estos receptores inducen una gran cantidad de respuestas celulares que además de la fagocitosis incluyen la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA), la liberación de mediadores inflamatorios y la producción y secreción de citocinas.

#### **4.2 Receptores Fc $\gamma$ R**

La mayoría de los receptores localizados en la superficie de la membrana celular incluyendo a los receptores Fc $\gamma$ R presentan en su estructura dos regiones. Una región de reconocimiento o detección de los estímulos y una región efectora encargada de desencadenar la secuencia de eventos al interior de la célula.

Los receptores Fc $\gamma$ R muestran una alta homología entre ellos en su porción extracelular que contiene el sitio de reconocimiento para la porción Fc de la inmunoglobulina G (IgG). La mayoría de sus diferencias se encuentran en la región transmembranal y la región citoplasmática [3].

A la fecha se reconocen tres tipos de receptores Fc $\gamma$ R humanos: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. A su vez cada uno de éstos consiste de varias isoformas individuales (Figura 1)

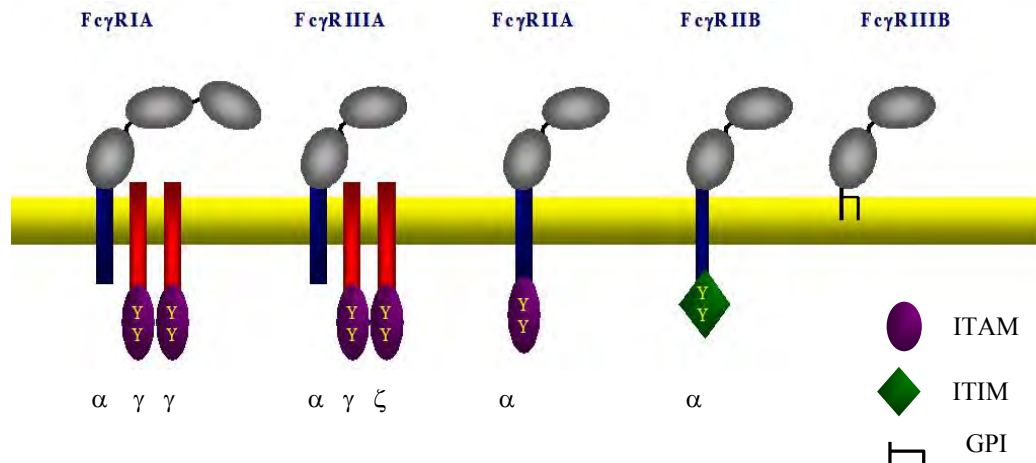


Figura 1 Representación esquemática de los receptores Fc $\gamma$ R en el humano. Los receptores Fc $\gamma$ R tienen regiones tipo inmunoglobulinas en la superficie de la membrana, unidas a una cadena  $\alpha$ , con excepción del receptor Fc $\gamma$ RIIIB que se encuentra unido a una molécula de Glicosilfosfatidil inositol (GPI). En la región citoplasmática los Fc $\gamma$ R pueden presentar una secuencia ITAM en la cadena  $\alpha$  como el caso del Fc $\gamma$ RIIA ó en cadenas asociadas  $\gamma$  y  $\zeta$  como los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIIIA. El receptor Fc $\gamma$ RIIB tiene una secuencia ITIM en su cadena  $\alpha$ . El receptor Fc $\gamma$ RIIIB no tiene región transmembranal ni región citoplasmática.

### **Fc $\gamma$ RI**

El Fc $\gamma$ RI (CD64), es un receptor de alta afinidad para inmunoglobulinas, con un peso molecular de 72 kDa y una constante de disociación (Kd) de  $10^{-9}$  M. Fc $\gamma$ RI se expresa principalmente sobre monocitos, macrófagos y neutrófilos estimulados con interferón  $\gamma$ . El receptor Fc $\gamma$ RI presenta tres regiones tipo inmunoglobulina en su porción extracelular y es capaz de unirse a IgG monomérica [2].



### ***Fc $\gamma$ RII***

El Fc $\gamma$ RII (CD32), es un receptor de baja afinidad para inmunoglobulinas, tiene un peso molecular de 40 kDa y una constante de disociación (Kd) de  $10^{-7}$  M. El receptor Fc $\gamma$ RII presenta dos regiones para IgG en su porción extracelular y sólo es capaz de unirse a IgG multimérica. El receptor Fc $\gamma$ RII se expresa en casi todos los leucocitos incluyendo neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y células B. Su expresión sobre neutrófilos y monocitos no es regulada por citocinas como es el caso para los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIII [2].

Hay dos isoformas de Fc $\gamma$ RII: Fc $\gamma$ RIIA que es un receptor activador y Fc $\gamma$ RIIB que es un receptor inhibidor. El receptor Fc $\gamma$ RIIA expresado en neutrófilos y macrófagos inicia una serie de reacciones bioquímicas que llevan a diferentes funciones celulares como son la fagocitosis y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo [2]. Por su parte el receptor Fc $\gamma$ RIIB es expresado principalmente en células B, además de macrófagos y neutrófilos. El receptor Fc $\gamma$ RIIB inicia una serie de reacciones bioquímicas que llevan a la inhibición de las funciones celulares activadas por los receptores Fc activadores (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, y Fc $\gamma$ RIIA).

### ***Fc $\gamma$ RIII***

El Fc $\gamma$ RIII (CD16). es una proteína glicosilada. Su peso molecular varia entre los 50 y los 80 kDa y tiene una constante de disociación (Kd) de  $10^{-7}$  M. Al igual que el receptor Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII es un receptor de baja afinidad para IgG monomérica y presenta dos regiones para IgG. El receptor Fc $\gamma$ RIII es codificado por dos genes y tiene dos isoformas: el receptor Fc $\gamma$ RIIIA expresado en células NK, macrófagos y monocitos y el receptor Fc $\gamma$ RIIIB expresado exclusivamente en

neutrófilos. A diferencia del receptor Fc $\gamma$ RIIIA y los otros tipos de receptores Fc $\gamma$ R, el Fc $\gamma$ RIIIB no contiene una región transmembranal ni una cola citoplasmática. Este receptor está unido a la membrana celular por una molécula de glicosilfosfatidil inositol (GPI) [2,4].

Los receptores Fc $\gamma$ RIIIA y Fc $\gamma$ RIIIB son casi idénticos con una identidad en la secuencia de aminoácidos de alrededor del 97%. La pérdida de las regiones transmembranal y citoplasmática por parte del receptor Fc $\gamma$ RIIIB se debe a la presencia de una serina en la posición 185 del receptor Fc $\gamma$ RIIIB. Este aminoácido es esencial para que el receptor se ancle a la membrana a través de una molécula de glicosilfosfatidil inositol. Por el contrario, el receptor Fc $\gamma$ RIIIA tiene una fenilalanina en lugar de la serina, lo que resulta en que el receptor Fc $\gamma$ RIIIA tenga una región transmembranal y una región citoplasmática [2].

#### **4.3 Transducción de señales de los receptores Fc**

Las señales de activación por los receptores Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIA, están asociadas a una secuencia de aminoácidos llamada ITAM (del inglés Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif) presente en la porción citoplasmática de estos receptores. La región ITAM consiste en dos pares de tirosinas dentro de una secuencia consenso de aminoácidos D/E – X<sub>7</sub> – D/E – X<sub>2</sub> – Y – X – X – L – X<sub>7</sub> – Y – X – X – L donde D es ácido aspártico, E es ácido glutámico, Y es tirosina, L es leucina, y X es cualquier aminoácido [3].

Las tirosinas presentes en el ITAM son esenciales para el inicio de la señalización por los receptores Fc $\gamma$ R [3]. El entrecruzamiento de los receptores Fc $\gamma$ R estimula la activación de cinasas de la familia Src que fosforilan las tirosinas

presentes en el ITAM, volviéndolas sitios de anclaje para la tirosina cinasa Syk. La activación de Syk cataliza la fosforilación y activación de varios substratos incluyendo a las enzimas fosfolipasa C gamma (PLC  $\gamma$ ), fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3-K), ERK y GTPasas de la familia Rho [1] (Figura 2).

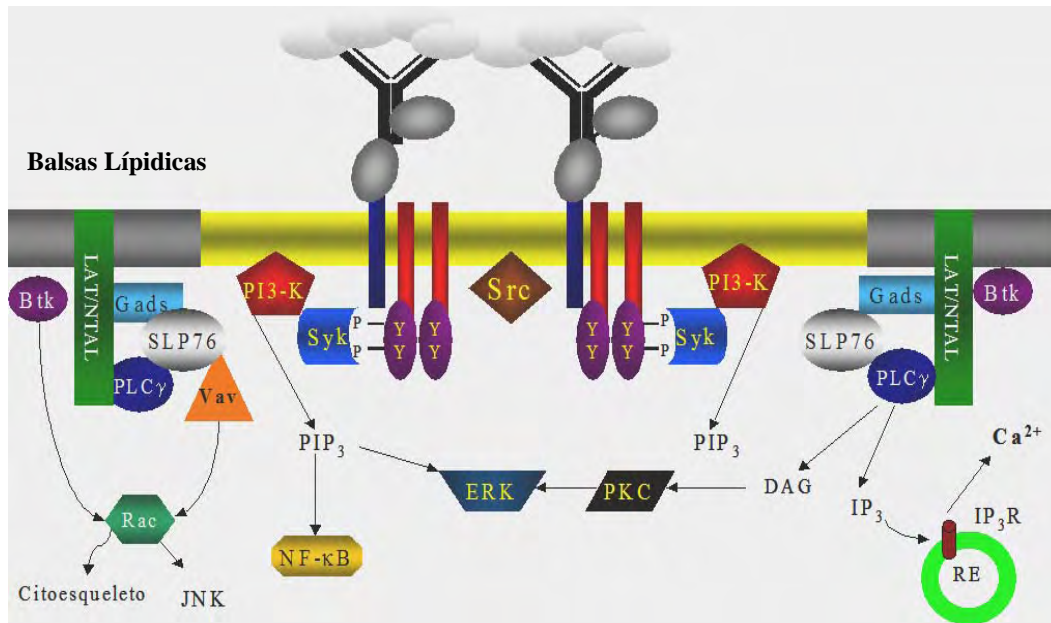


Figura 2 Vía de señalización de los receptores Fc $\gamma$ R. El entrecruzamiento de los receptores Fc $\gamma$ R con complejos antígeno (esferas blancas) anticuerpo, induce la fosforilación de las tirosinas presentes en la secuencia ITAM en su región citoplasmática. En este proceso participan cinasas de la familia de Src y cinasas de la familia de Syk. El reclutamiento de Syk en la región ITAM lleva a la activación de un complejo de señalización en el que participan SLP76 (proteína de leucocitos de 76 KDa que contiene una región SH2), LAT (Ligando para la activación de células T) el cual interactúa con la proteína adaptadora Gads. En este complejo también es reclutado PLC $\gamma$  (Fosfolipasa C gamma -1) que produce, Diacil glicerol (DAG) e Inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) este último se encarga de la liberación de calcio en Retículo endoplásmico (RE). Diacil glicerol se encarga de la activación de la proteína cinasa C (PKC) la cual lleva a la activación de la cinasa ERK, la cual también puede ser activada por la cinasa de fosfatidil inositol (PI3K) a través de su producto fosfatidil inositol trifosfato (PIP<sub>3</sub>). La activación de los receptores Fc $\gamma$ R también lleva a la activación de GTPasa de la familia Rho y Rac y de factores nucleares como NF $\kappa$ B [63].

Contrario a las señales de activación causadas por el entrecruzamiento de receptores  $Fc\gamma R$  que presentan secuencias ITAM, existen señales inhibitoras que ayudan a controlar las respuestas celulares. Estas señales son reguladas por una secuencia de aminoácidos llamada ITIM (del inglés Immunoreceptor Tyrosin-Based Inhibition Motif), presente en la región citoplasmática del receptor  $Fc\gamma RIIB$ .

La coagregación de  $Fc\gamma RIIB$  con el receptor de antígeno (BCR) lleva a una disminución de la actividad de los linfocitos B [1]. A diferencia de la región ITAM, la fosforilación de tirosina en la región ITIM provoca el reclutamiento de fosfatasas como SHIP-1 y SHP-2. Estas fosfatasas bloquean la cascada de señales mediada por la fosforilación en la secuencia ITAM presentes en los receptores activadores (Figura 3).

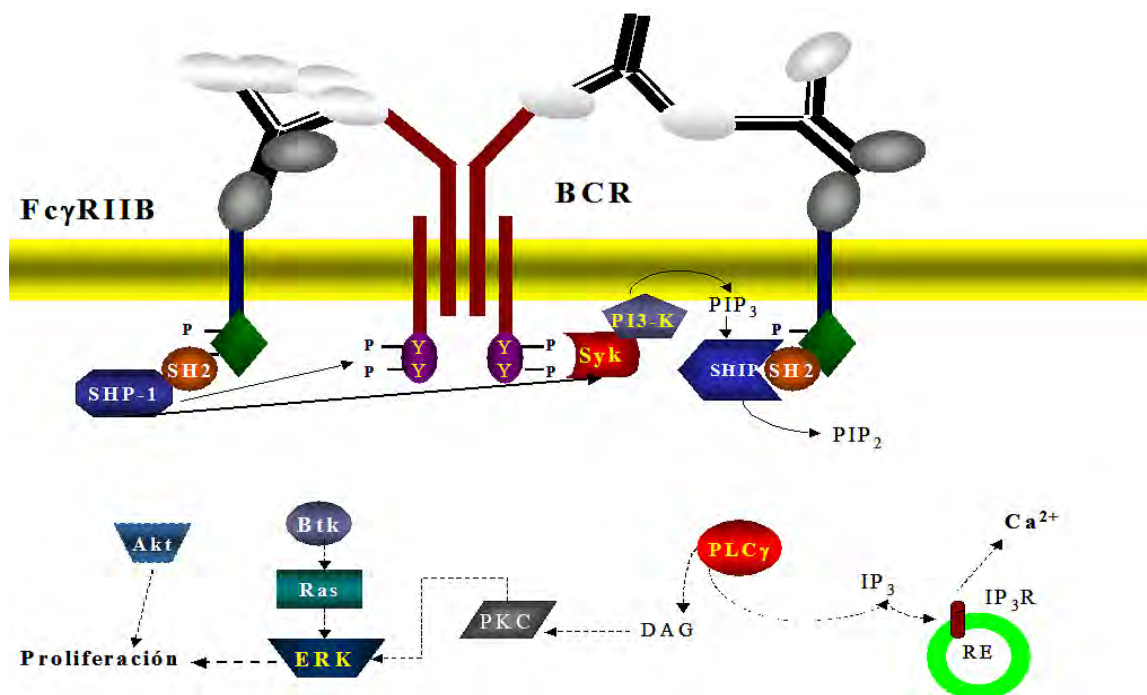


Figura 3. Mecanismo de inhibición del receptor  $Fc\gamma RIIB$ . El entrecruzamiento del  $Fc\gamma RIIB$  con complejos antígeno (esferas blancas) anticuerpo lleva a la fosforilación de las tirosinas presentes en la secuencia ITIM. Esto sirve como un sitio de anclaje para las fosfatasas SHIP y SHP-1 que degrada al PIP<sub>3</sub> producto de PI3K y desfosforilan las tirosinas presentes en la región ITAM del receptor de linfocitos B respectivamente, evitando de esta forma la señalización al interior de la célula [1].

#### 4.4 Neutrófilos

Los neutrófilos son células fagocíticas de vida media corta que representan del 50% al 60% de los leucocitos totales en circulación y son la primera línea de defensa contra agentes infecciosos [5]. Los neutrófilos juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria aguda y son capaces de responder a agentes quimio-tácticos, migrando a los sitios de daño. El proceso de migración es acompañado de la activación de los neutrófilos. A su llegada a los sitios de inflamación los neutrófilos fagocitan y destruyen al agente causal de la inflamación [6].

Se ha reportado que la activación de los neutrófilos regula al menos dos respuestas a nivel transcripcional: la producción de citocinas pro-inflamatorias y la inhibición de la apoptosis [7].

La activación de los neutrófilos se lleva a cabo por los receptores presentes en la superficie de la membrana de los neutrófilos incluyendo a los receptores  $Fc\gamma R$ . Los neutrófilos humanos presentan dos tipos de receptores  $Fc\gamma R$  de forma constitutiva; el receptor  $Fc\gamma RIIA$  y el receptor  $Fc\gamma RIIB$ . En el neutrófilo la expresión del receptor  $Fc\gamma RIIB$  es diez veces mayor que la expresión del receptor  $Fc\gamma RIIA$  [8], lo que sugiere que el receptor  $Fc\gamma RIIB$  lleva a cabo un mayor reconocimiento de complejos inmunes [9]. Las funciones del receptor  $Fc\gamma RIIA$  han sido descritas en distintas células fagocíticas incluyendo a los neutrófilos. En estas células la activación del  $Fc\gamma RIIA$  inicia una cascada de señales dependientes de proteínas tirosinas cinasas de la familia de Src, que comienza con la fosforilación de las tirosinas presentes en la región ITAM del receptor, seguida de la activación de

Syk. Syk a su vez, activa una gran cantidad de substratos, entre los cuales se encuentra PI3K [9,10].

Las funciones del receptor Fc $\gamma$ RIIIB también han sido descritas en neutrófilos. Se ha reportado que el entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIIB provoca un incremento en la liberación de Ca<sup>2+</sup> de vesículas intracelulares [8,11], polimerización de filamentos de actina [12], fosforilación de cinasas de la familia Src [11], activación de ERK [10], y activación de integrinas [13]. Otras respuestas inducidas por el entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIIB son la fagocitosis [14] y el estallido respiratorio [8] así como la liberación de enzimas lisosomales en respuesta a la unión con complejos inmunes [15]. También el receptor Fc $\gamma$ RIIIB es capaz de llevar a cabo la degranulación de neutrófilos a través de la participación de cinasas de la familia de Tec [16] y la activación de NF $\kappa$ B [17]. La activación de NF $\kappa$ B a través de receptores presentes en la membrana celular se ha implicado en la inhibición de apoptosis en el neutrófilo [18-20].

A pesar de todos estos reportes, aún queda por aclarar cuál es la cascada de señales que el Fc $\gamma$ RIIIB usa para inducir todas estas respuestas. El receptor Fc $\gamma$ RIIIB no presenta una secuencia ITAM ni una región citoplasmática que pueda iniciar una cascada de señales al interior del neutrófilo.

Para entender cuál es la vía de señalización que utiliza el receptor Fc $\gamma$ RIIIB se han realizado diversos estudios. Se ha reportado que la liberación de calcio intracelular inducida por el entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIIB es independiente al metabolito inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) ya que se encontró que el entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIIB no induce un aumento en los niveles de IP<sub>3</sub>

[8,21]. Mientras que otro estudio sugiere que las cinasas de la familia Tec son importantes en la vía de señalización que lleva a la degranulación [16].

#### **4.5 Modelos de la vía de señalización del receptor Fc $\gamma$ RIIIB**

Las señales inducidas por el entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIIB han sido también atribuidas a distintas interacciones entre el receptor Fc $\gamma$ RIIIB y otras moléculas como integrinas o el receptor Fc $\gamma$ RIIA [22]. Se ha propuesto que estas moléculas podrían servir como intermediarios en la transducción de señales por parte del receptor Fc $\gamma$ RIIIB.

Entre los modelos descritos para la transducción de señales por parte del receptor Fc $\gamma$ RIIIB se encuentra la acción conjunta con el receptor Fc $\gamma$ RIIA [9]. En este modelo se sugiere que el receptor Fc $\gamma$ RIIIB funciona como una molécula que aumenta la presentación de complejos inmunes hacia el receptor Fc $\gamma$ RIIA el cual sería el encargado de enviar señales al interior de la célula.[23-25]. Esto porque se ha reportado que el entrecruzamiento simultáneo de ambos receptores lleva a una mayor liberación de calcio intracelular que cuando sólo se entrecruza al receptor Fc $\gamma$ RIIA [26,27]. La vía de señal usada es dependiente de PI3K y del segundo mensajero Inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) [22]. Sin embargo, como se mencionó arriba, se ha reportado que el receptor Fc $\gamma$ RIIIB es capaz de llevar a cabo la movilización de calcio intracelular en una vía independiente de IP<sub>3</sub> [8,21]. Esto apoya la idea de una vía de señalización propia por parte del receptor Fc $\gamma$ RIIIB.

Otro modelo sugiere que la señalización del receptor Fc $\gamma$ RIIIB, es a través de integrinas, ya que se ha reportado que las integrinas pueden modificar la actividad de los receptores Fc $\gamma$ R en los neutrófilos [28]. También se ha reportado

que el receptor Fc $\gamma$ RIIIB y la integrina  $\beta_2$  colocan en respuesta a estimulación con complejos inmunes [29-32]. En este modelo el receptor Fc $\gamma$ RIIIB se asocia a la integrina  $\alpha M\beta_2$ , y que ésta se encarga de iniciar la señalización al interior de la célula [33]. Otro punto que apoya este modelo es que la integrina  $\alpha M\beta_2$  es capaz de mediar fagocitosis activando distintas respuestas celulares como: la liberación de calcio intracelular, polimerización de la actina y activación de proteínas cinasas como ERK [29,32-35]. Estas respuestas también se han observado por parte del receptor Fc $\gamma$ RIIIB después de su entrecruzamiento [35].

A pesar de estos modelos, existen diversos reportes en los que se ha sugerido que el receptor Fc $\gamma$ RIIIB es capaz de iniciar una cascada de señales de manera independiente del receptor Fc $\gamma$ RIIA ó de la asociación con integrinas  $\beta_2$  [13,16,17,36-38]. Por ejemplo, se ha reportado que el receptor Fc $\gamma$ RIIA en neutrófilos promueve un incremento en la expresión de integrinas  $\beta_2$  [13,39], pero no tiene efecto sobre las integrinas  $\beta_1$ . Sin embargo, el receptor Fc $\gamma$ RIIIB no sólo es capaz de aumentar la presencia de integrinas  $\beta_2$ , sino que además promueve la activación de integrinas  $\beta_1$  en neutrófilos [13]. Más aún, el incremento de integrinas  $\beta_2$  por el Fc $\gamma$ RIIIB es mediado por tirosinas cinasas de la familia Src, además de las cinasas Syk y PI3K, mientras que la activación de integrinas  $\beta_1$  es independiente de estas dos enzimas [13]. Otro reporte mostró que el entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIIB en neutrófilos induce la fosforilación de ERK y de Elk en el núcleo, mientras que el receptor Fc $\gamma$ RIIA no es capaz de inducir esta respuesta [17].



El mecanismo de señalamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIB sigue siendo una incógnita muy interesante por resolver. Es muy probable que el Fc $\gamma$ RIIB utilice otras moléculas para asociarse a ellas y señalar, pero estas moléculas no son el receptor Fc $\gamma$ RIIA ni la integrina  $\beta_2$ .

## 5. JUSTIFICACIÓN

El estudio de los mecanismos de transducción de señales del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  en neutrófilos no ha avanzado mucho debido a las limitaciones que éstas células presentan para manipulaciones bioquímicas y de biología molecular. Entre estas limitantes tenemos un tiempo de vida media muy corto. Los neutrófilos sobreviven sólo de 8 a 12 horas. También los neutrófilos no se pueden transfectar eficientemente, ni se pueden mantener en cultivo. Por lo tanto contar con una línea celular que exprese al receptor  $Fc\gamma RIIIB$  podría ayudar usando técnicas no viables en el neutrófilo para estudiar las vías de señalización que involucran al receptor  $Fc\gamma RIIIB$ . El propósito de este proyecto es crear una línea celular que sirva de modelo para el estudio de la transducción de señales mediadas por el receptor  $Fc\gamma RIIIB$ .

Se escogió a la línea celular promielocítica HL-60 que no expresa al receptor  $Fc\gamma RIIIB$ , ya que permite el uso de técnicas de biología molecular para su estudio y puede ser diferenciada a neutrófilos por un tratamiento con DMSO [40-42].

## **6. Hipótesis**

El receptor  $Fc\gamma RIIIB$  expresado en la línea celular promielocítica HL-60 será capaz de activar a la cinasa ERK y llevar a cabo el aumento de calcio intracelular.

## **7. Objetivos**

- 1) Cultivar la línea celular HL-60.
- 2) Transfectar eficientemente a las células HL-60.
- 3) Seleccionar una clona de células HL-60 que exprese el receptor Fc $\gamma$ RIIIB
- 4) Medir la liberación de calcio inducida por la estimulación del receptor Fc $\gamma$ RIIIB en la línea celular generada.
- 5) Estudiar la activación de la cinasa ERK inducida por la estimulación del receptor Fc $\gamma$ RIIIB en la línea celular generada.

## **8. Metodología**

### **8.1 Cultivo celular**

El cultivo celular permite mantener en crecimiento constante a distintos tipos celulares en condiciones controladas de temperatura (37°C), pH (7.4) y CO<sub>2</sub> (5%). La línea celular promielocítica humana HL-60 (ATCC No. CCL-240) se cultiva en medio OptiMEM (GIBCO) suplementado con 2mM de glutamina y 10 % de suero fetal bovino (SFB). Se debe mantener a una densidad de entre 1 x 10<sup>5</sup> a 1 x 10<sup>6</sup> células por mililitro (cel/ml) y se debe cambiar el medio cada 2 ó 3 días.

### **8.2 Transfección de la línea celular HL-60**

La transfección es un método que permite la introducción de DNA externo a una célula, con el propósito de que la célula exprese a una proteína de interés. Existen distintos métodos de transfección. Entre estos métodos se encuentran: la transfección con lipofectamina, la transfección con DEAE-DEXTRAN, la transfección con cloruro de calcio y la transfección por electroporación.

La electroporación es un método en el que se proporciona una descarga eléctrica a las células con el fin de hacer poros en la membrana celular y de esta forma permitir la entrada del DNA a la célula.

Las células HL-60 (20 x 10<sup>6</sup> células) se transfectaron por electroporación a un pulso de 310 V y 1050 µF en un Easyject Electroporador Plus con el plásmido pGL3c que codifica para la enzima luciferasa ó el plásmido pcDNA3 que contiene el gen que codifica para el receptor FcγRIIIB (pcDNA3/FcγRIIIB). Las células transfectadas con el pcDNA3/FcγRIIIB posteriormente se crecieron en medio OptiMEM suplementado con 2 mM glutamina, 10 % SFB y el antibiótico geneticina

a una concentración de 800  $\mu\text{g/ml}$  con el fin de sólo permitir el crecimiento de aquellas células que fueron transfectadas positivamente.

### **8.3 Citometría de flujo**

La citometría de flujo es una técnica de análisis cuantitativo, que permite medir ciertas características físicas y químicas de la célula o partículas en suspensión, las cuales producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz.

La citometría de flujo se basa en hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas, una a una delante de un haz luminoso. La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o partícula al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora.

**Determinación del receptor Fc $\gamma$ RIIIB por citometría de flujo.** Recolectar  $1 \times 10^6$  células HL-60 (por muestra) en tubos eppendorf, centrifugar 1 minuto a 2160 g y eliminar el sobrenadante. Después resuspender las células en 100  $\mu\text{l}$  de buffer de FACS [Buffer de Fosfatos (PBS) + 0.5% de Albúmina Sérica Bovina (BSA) + 1% de sacarosa] y añadir 50  $\mu\text{l}$  de anticuerpo monoclonal 3G8 (específico para el receptor Fc $\gamma$ RIIIB, ya que reconocer la región tipo inmunoglobulina del receptor) a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  en PBS. Incubar las células 45 min., a 4 °C. Posteriormente lavar las células 3 veces con buffer de FACS, centrifugar 1 min

a 2160 g después de cada lavado (resuspender cada vez en 1ml). Una vez finalizados los lavados, resuspender las células en 100  $\mu$ l de buffer de FACS y añadir 20  $\mu$ l de una dilución 1:10 del anticuerpo secundario F(ab')<sub>2</sub> anti-IgG de ratón marcado con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC). Mezclar e incubar 30 min a 4 °C. Lavar 3 veces con buffer FACS (centrifugar 1min a 6000rpm después de cada lavado). Después del ultimo lavado resuspender las células en 300  $\mu$ l de paraformaldehído al 1% (en PBS). Guardar las células a 4°C en oscuridad hasta su uso.

#### **8.4 Selección de célula positivas para el receptor Fc $\gamma$ RIIIB por Sorting**

El sorting es una técnica en la que por citometría de flujo se puede hacer una selección restringida de células con el propósito de separar y obtener sólo aquellas células que expresen a la proteína de interés, descartando todas aquellas células que no la expresen.

Las células HL-60 positivas para el receptor Fc $\gamma$ RIIIB se separan por medio de una selección restringida de células por citometría de flujo en condiciones asépticas en un citómetro de flujo FACSARIA (Becton Dickinson). Primero las células se marcan con el anticuerpo monoclonal 3G8 y se incuban 45 min., a 4°C. Posteriormente la células se lavan 3 veces con buffer de FACS estéril, centrifugando 1min., a 2160 g cada vez. Después las células se resuspenden en buffer de FACS y se incuban con el anticuerpo secundario F(ab')<sub>2</sub> anti-IgG de ratón marcado con el fluorocromo FITC 30 min., a 4°C. Después se lavan 3 veces en buffer de FACS y por último se seleccionan las células positivas pasándolas en un citómetro de flujo. Las células positivas para el receptor Fc $\gamma$ RIIIB obtenidas por

citometría de flujo se cultivan en medio OptiMEM suplementado con 2 mM de glutamina, 10 % SFB y el antibiótico geneticina a una concentración de 800 µg/ml.

### **8.5 Medición de calcio intracelular**

La medición de calcio intracelular se realizó a través de método de Fura 2/AM. El Fura 2/AM es un fluorocromo que tiene un grupo amino esteroide el cual le permite al Fura 2/AM ser internalizado a la célula. Una vez en el interior de la célula el Fura 2 pierde el grupo amino esteroide y ya no puede salir de la célula. En el interior de la célula el Fura 2 se une al calcio intracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y queda en dos formas: en complejo con el  $\text{Ca}^{2+}$  y en forma libre. Cada una de estas formas del Fura 2 fluoresce a una longitud de onda diferente. Esto permite hacer una relación que sirve para calcular los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  provocados por la activación de la célula.

#### ***Cargado de Fura 2/AM***

Las células HL-60 se resuspenden a  $1 \times 10^7$  células en 100 µl de PBS + 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  +1.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  y se incuban con 10 µM de fura 2/AM a 37 °C por 5 min., después las células se diluyen a  $1 \times 10^7$  cel/ml y se incuban por otros 20 min a 37°C. Terminada la incubación las células se lavan con PBS + 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  +1.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , para eliminar el fura que no se internalizó a la célula, centrifugando a 250 g (centrífuga Sorvall Dupont Instruments. Modelo H1000B, rotor 6000D) por 5 min, se resuspenden a  $1 \times 10^7$  cel/ml y se incuban por otros 15 min., a 37°C. Por último las células se lavan nuevamente con PBS + 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  +1.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , se centrifugan a 250 g por 5 min., y se resuspenden a  $1 \times 10^7$  cel/ml en PBS + 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  +1.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ . Se mantienen a 4 °C hasta su uso.



### ***Estimulación de las células***

Se toman  $5 \times 10^6$  células HL-60 cargadas con fura 2/AM y se incuban con el anticuerpo monoclonal 3G8 para el receptor Fc $\gamma$ RIIIB ó con el anticuerpo monoclonal IV.3 para el receptor Fc $\gamma$ RIIA a una concentración de 10  $\mu$ g/ml durante 30 min., a 4°C. Posteriormente las células se lavan 3 veces con PBS + 1.5 mM Ca<sup>2+</sup> +1.5 mM Mg<sup>2+</sup>, centrifugando cada vez a 250 g por 5 min. Por último las células se resuspenden a una concentración de  $5 \times 10^6$  células en 2 ml de PBS + 1.5 mM Ca<sup>2+</sup> +1.5 mM Mg<sup>2+</sup>. Las células se ponen en celdas espectrofotométricas y se colocan en un espectrofluorometro ( Modelo L55 luminescence spectrometer; Perkin Elmer Instruments) ajustando a las longitudes de onda de excitación a 340 y a 380 nm y a una longitud de onda de 540 nm para su emisión. Una vez iniciada la medición se entrecruzan los receptores Fc $\gamma$ RIIIB y Fc $\gamma$ RIIA con el anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> anti-IgG de ratón a una concentración de 60  $\mu$ g/ml y se registran los cambios de fluorescencia en tiempo real. Las concentraciones de calcio se calculan de acuerdo al método descrito por Grynkiewicz et. al (15).

### **8.6 Medición de ERK por Western Blot**

El Western Blot es un método que permite la detección de proteínas de un homogenizado celular. Las proteínas son separadas por electroforesis en un gel de acrilamida y posteriormente son transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Una vez que las proteínas se encuentran en la membrana se usan anticuerpos específicos para la proteína que permitan su detección.

### ***Estimulación***

Las células HL-60 positivas para el Fc $\gamma$ RIIIB se recolectan y ajustan a  $3 \times 10^6$  células en 300  $\mu$ l de PBS por muestra, esta se incuban con el anticuerpo monoclonal 3G8 a una concentración de 10  $\mu$ g/ml para el receptor Fc $\gamma$ RIIIB ó con el anticuerpo monoclonal IV.3 a una concentración de 10  $\mu$ g/ml para el receptor Fc $\gamma$ RIIA durante 30 min. a 4°C. Después las células se lavan con 1000  $\mu$ l PBS y se centrifugan 1 min. a 2160 g. Posteriormente las células se resuspenden en PBS + el anticuerpo entrecruzados F (ab')<sub>2</sub> anti-IgG de ratón a una concentración de 60  $\mu$ g/ml y se incuban 3 min. a 37°C, la reacción se detiene añadiendo 1000  $\mu$ l de PBS frío. Las células se centrifugan a 2160 g por 1 min. y se elimina todo el sobrenadante.

### ***Lisado de las células***

Las células HL-60 se lisan en 30  $\mu$ l de buffer RIPA modificado (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM HEPES, 0.5% deoxicolato de sodio, 1% Nonidet P-40 (NP-40), 10 mM 2-mercaptoetanol, pH 7.5, junto con los inhibidores de proteasas PMSF a 1mM y C400 a 40  $\mu$ g/ml), incubando 20 min a 4°C. Posteriormente los lisados celulares se centrifugan a 10000 g por 10 min. en frío. Recuperar los sobrenadantes en tubos limpios.

### ***Western Blot***

Se toman 25  $\mu$ l del lisado celular (sobrenadante) y 15  $\mu$ l de buffer de muestra, para ver la presencia de ERK ó ERK fosforilada (pERK) después de la activación de los receptores Fc $\gamma$ R. Las proteínas se corren en un gel de poliacrilamida al 12 % a 20 mAmp y posteriormente las proteínas se transfieren a

una membrana de fluoruro de polivinilidino (Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA) durante 1 hora a 500 mA en una cámara de transferencia. Después la membrana se bloquea con PBS + 5% de leche + 0.05% de Tween 20 durante toda la noche a 4°C en agitación, al día siguiente, la membrana se incuba 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario (anti-ERK ó anti-pERK) a una dilución 1 :1000, se lava la membrana 5 veces con buffer de lavado (PBS + 0.05% de Tween 20) y se incuba 1 hora con el anticuerpo secundario HRP-anti IgG a una dilución de 1:5000 en PBS + 5% de Leche + 0.05% de Tween 20. Por último la membrana se lava 5 veces con buffer de lavado y se revela usando un reactivo de quimioluminiscencia (Pierce, Rockford, IL).

## 9. Resultados

### 9.1 Expresión del receptor Fc $\gamma$ RIIIB en células HL-60

La línea celular HL-60 es una línea de origen promielocítico, que puede ser diferenciada a distintos tipos celulares incluyendo el neutrófilo. Esto a través de un tratamiento por 6 días con Dimetil Sulfoxido (DMSO) [40,41]. Se ha reportado que las células HL-60 al ser diferenciadas a neutrófilos son capaces de responder al estímulo con Interleucina-8 (IL-8)[43]. Además las células HL-60 diferenciadas son capaces de producir superóxidos y de reducir el azul de tetrazolio al igual que lo llevan acabo los neutrófilos [44-46]. Sin embargo, existe poca información acerca de los cambios en la expresión de los receptores Fc $\gamma$ R en esta línea celular una vez que se ha diferenciado a neutrófilos [42]. Por esta razón fue importante determinar los receptores que se expresan en las células HL-60 antes y después de ser diferenciadas con DMSO. En la figura 4 se observa la expresión del receptor Fc $\gamma$ RIIA y la ausencia del receptor Fc $\gamma$ RIIIB en células HL-60.

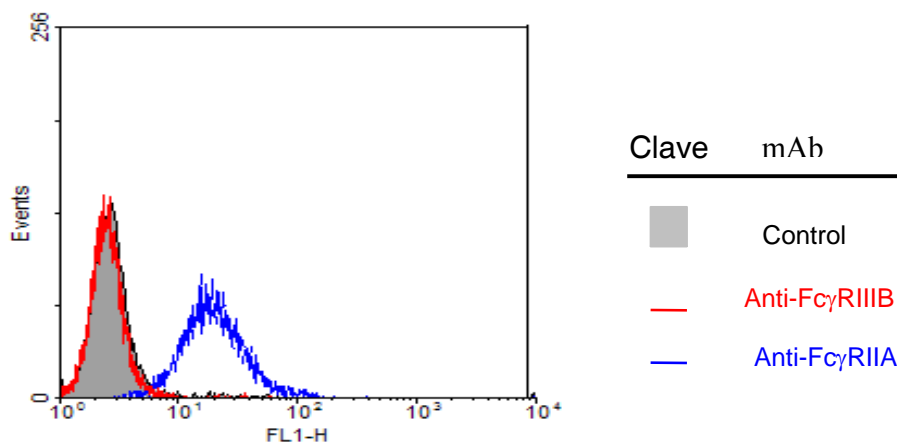


Fig. 4 Tinción de células HL-60. Sin anticuerpo (gris), con el anticuerpo 3G8 específico para el receptor Fc $\gamma$ RIIIB (línea roja) ó con el anticuerpo IV.3 específico para el receptor Fc $\gamma$ RIIA (línea azul).

Se ha sugerido que el receptor  $Fc\gamma RIII B$  es capaz de asociarse con otros receptores de membrana como las integrinas. Por esta razón se buscó la expresión de integrinas en la línea celular HL-60. En la figura 5 observamos que las células HL-60 expresan a las integrinas  $\beta_1$  y a las integrinas  $\beta_2$ . La expresión de integrinas  $\beta_2$  es mayor que la expresión de integrinas  $\beta_1$ .

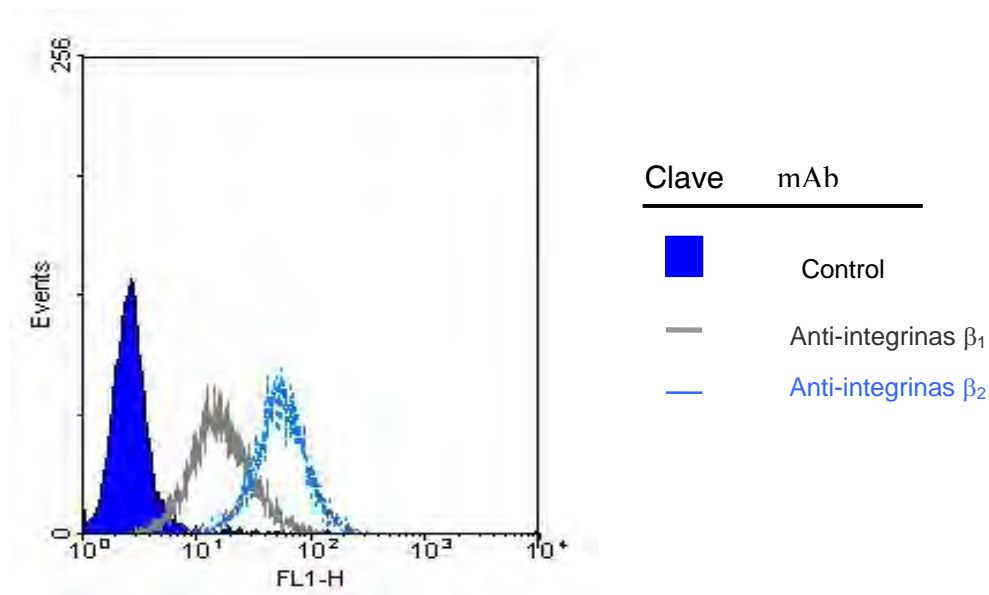


Fig.5 Tinción de células HL-60. Sin anticuerpo (cuadro azul), con el anticuerpo TS2/16 específico para integrinas  $\beta_1$  (línea gris) ó con el anticuerpo IB4 específico para integrinas  $\beta_2$  (línea azul).

Una vez que se observó que las células HL-60 sin diferenciar no expresan al receptor  $Fc\gamma RIII B$ , el siguiente paso fue ver si al ser tratadas con DMSO se inducía la expresión del receptor  $Fc\gamma R$ . En la figura 6 se muestra la expresión de los receptores  $Fc\gamma R$  en las células HL-60 después del tratamiento con DMSO por 6 días. Después de que las células son diferenciadas a neutrófilos por el tratamiento con DMSO no hay expresión del receptor  $Fc\gamma RIII B$ , mientras que la

expresión del receptor Fc $\gamma$ RIIA aumenta con respecto a las células HL-60 sin diferenciar.

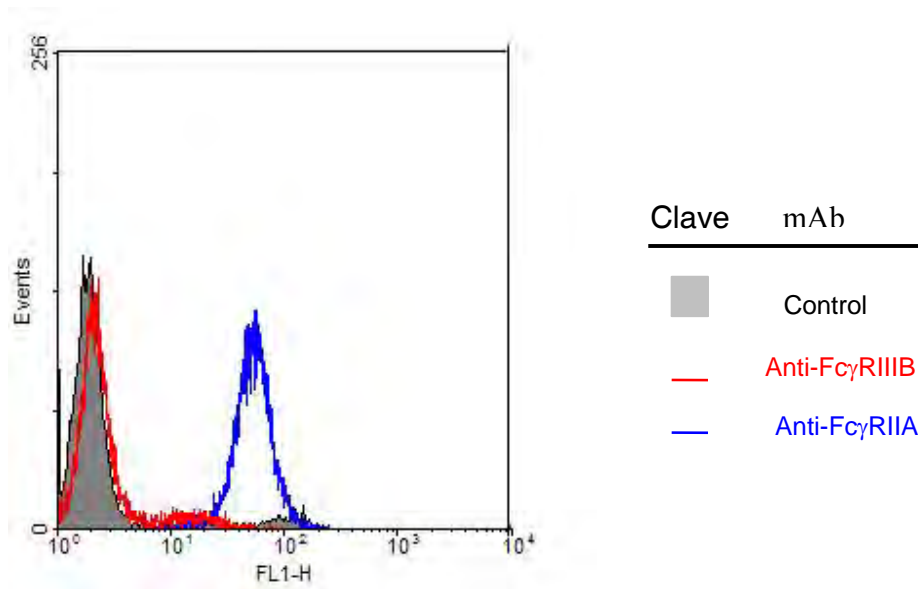


Fig. 6 Tinción de células HL-60 diferenciadas a neutrófilos con DMSO. Sin anticuerpo (gris), con el anticuerpo 3G8 específico para el receptor Fc $\gamma$ RIIB (línea roja) ó con el anticuerpo IV.3 específico para el receptor Fc $\gamma$ RIIA (línea azul).

También se determinó cómo se afecta la expresión de las integrinas  $\beta_1$  y de las integrinas  $\beta_2$  una vez que las células HL-60 son diferenciadas a neutrófilos. En la figura 7 podemos observar que la expresión de integrinas  $\beta_2$  aumenta ligeramente con respecto a su expresión en células HL-60 sin diferenciar, pero la expresión de las integrinas  $\beta_1$  aumenta considerablemente, una vez que las células HL-60 han sido tratadas con DMSO por 6 días (comparar figuras 5 y 7).

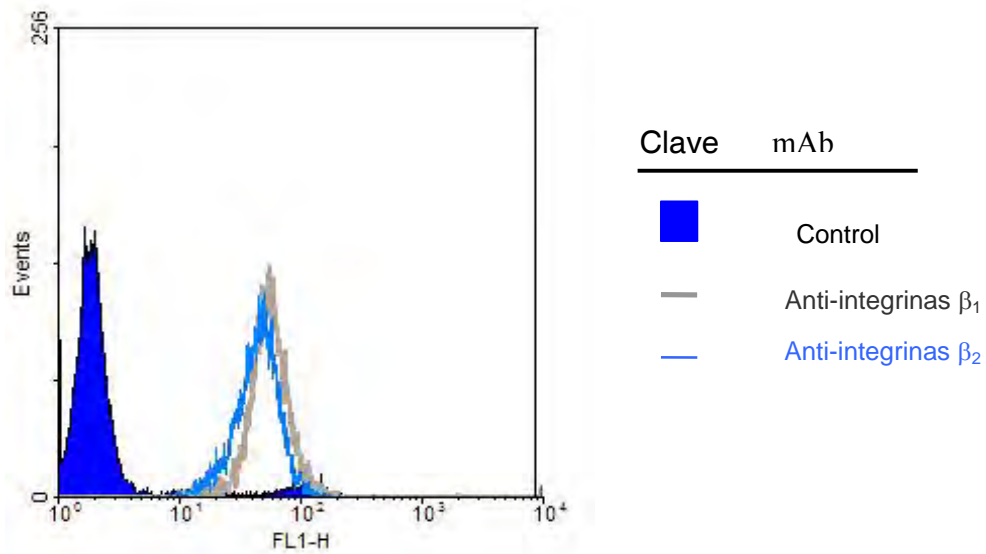


Fig. 7 Tinción de células HL-60. Sin anticuerpo (cuadro azul), con el anticuerpo TS2/16 específico para integrinas  $\beta_1$  (línea gris) ó con el anticuerpo IB4 específico para integrinas  $\beta_2$  (línea azul).

## 9.2 Transfección de las células HL-60

Una vez determinado que la línea celular HL-60 no expresa al receptor Fc $\gamma$ RIIIB, aún cuando las células son diferenciadas a neutrófilos, el siguiente paso fue encontrar un método de transfección eficiente para esta línea celular.

Se probaron tres métodos de transfección para la línea celular HL-60: DEAE-DEXTRAN, Lipofectamina 2000 y Electroporación. En la figura 8 se muestran los resultados después de transfectar a las células HL-60 con el plásmido pGL3c que codifica para la enzima luciferasa. Como se observa en la gráfica sólo el método por electroporación resultó eficiente para la línea celular HL-60.

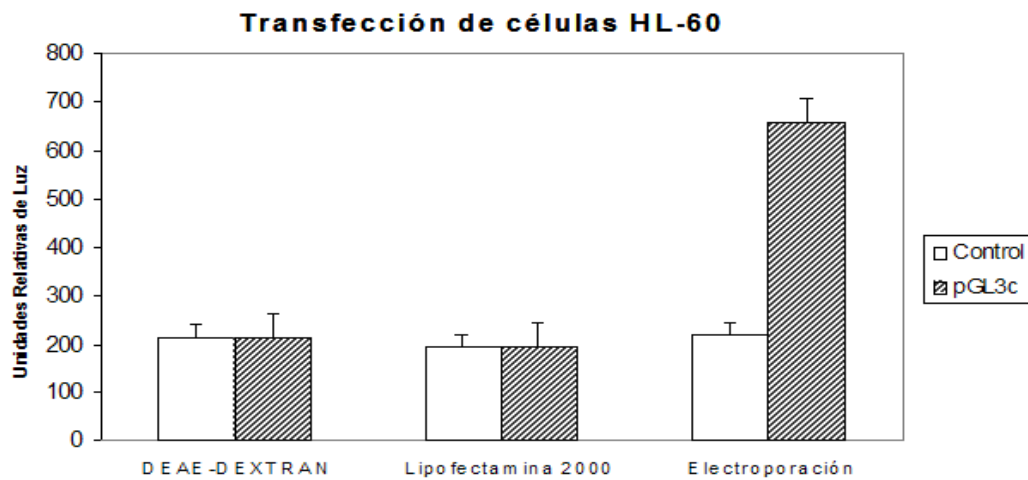


Fig. 8 Detección de la enzima luciferasa en células HL-60 transfectadas con el plásmido pGL3c.

Después de que se observó que las células HL-60 se podían transfectar por electroporación, entonces lo siguiente fue transfectarlas con un plásmido que codifica para el receptor  $Fc\gamma RIIIB$ . El plásmido base fue el pcDNA3/ $Fc\gamma RIIIB$ , que contiene un gen que proporciona resistencia contra el antibiótico geneticina. Esta resistencia permitió posteriormente hacer una selección de células positivas para el receptor  $Fc\gamma RIIIB$ . En la figura 9 se muestra la presencia del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  30 días después de la transfección por electroporación de células HL-60. Encontramos dos poblaciones de células HL-60 positivas para el receptor  $Fc\gamma RIIIB$ . La población que presenta mayor fluorescencia (desplazamiento de la curva hacia la derecha) expresa una mayor cantidad del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  sobre su superficie.



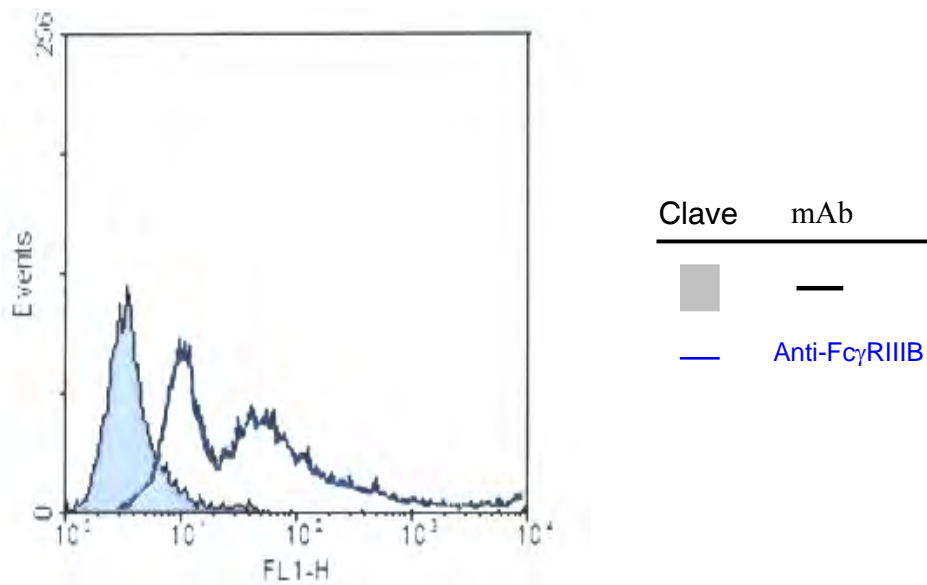


Fig. 9 Tinción de células HL-60 transfectadas con el Fc $\gamma$ RIIIB. Sin anticuerpo (cuadro gris) y con el anticuerpo 3G8 específico para el receptor Fc $\gamma$ RIIIB (línea azul).

### 9.3 Selección restringida de células HL-60 positivas para el receptor Fc $\gamma$ RIIIB

Para obtener una línea celular con expresión homogénea del receptor Fc $\gamma$ RIIIB, se realizó una selección restringida por citometría de flujo. En la figura 10 se observa la expresión del receptor Fc $\gamma$ RIIIB en células HL-60 seleccionadas por su mayor expresión del receptor Fc $\gamma$ RIIIB y separadas por una selección restringida de citometría de flujo. De esta forma se obtuvo a la línea celular estable HL-60 que expresa al receptor Fc $\gamma$ RIIIB. A esta línea celular se le dio el nombre de células H6 $\gamma$ 3B. Con esta línea celular se estudiaron las funciones del receptor Fc $\gamma$ RIIIB.

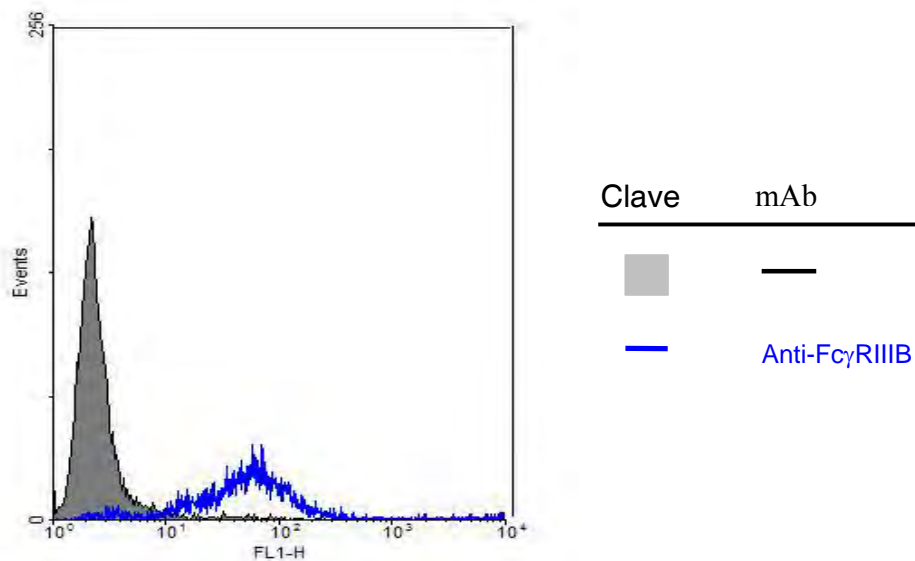


Fig. 10 Tinción de células HL-60 transfectadas con el receptor  $Fc\gamma RIIIB$ . Las células fueron separadas por selección restringida de citometría de flujo y después teñidas, sin anticuerpo (cuadro gris) ó con el anticuerpo 3G8 específico para el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  (línea azul).

#### 9.4 Expresión de los receptores presentes en la línea celular H6 $\gamma$ 3B.

Antes de empezar a estudiar las funciones del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  en las células H6 $\gamma$ 3B había que comprobar si el receptor  $Fc\gamma RIIA$  y las integrinas  $\beta_1$  y  $\beta_2$  no se hubieran alterado después de la transfección. En la figura 11 se observa que el receptor  $Fc\gamma RIIA$  se expresa al mismo nivel en células HL-60 y en células H6 $\gamma$ 3B. De la misma forma la expresión de integrinas  $\beta_1$  no cambió en las células que expresan el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  (Figura 12). La expresión de las integrinas  $\beta_2$  tampoco cambió por la transfección y expresión del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  (Figura 13).

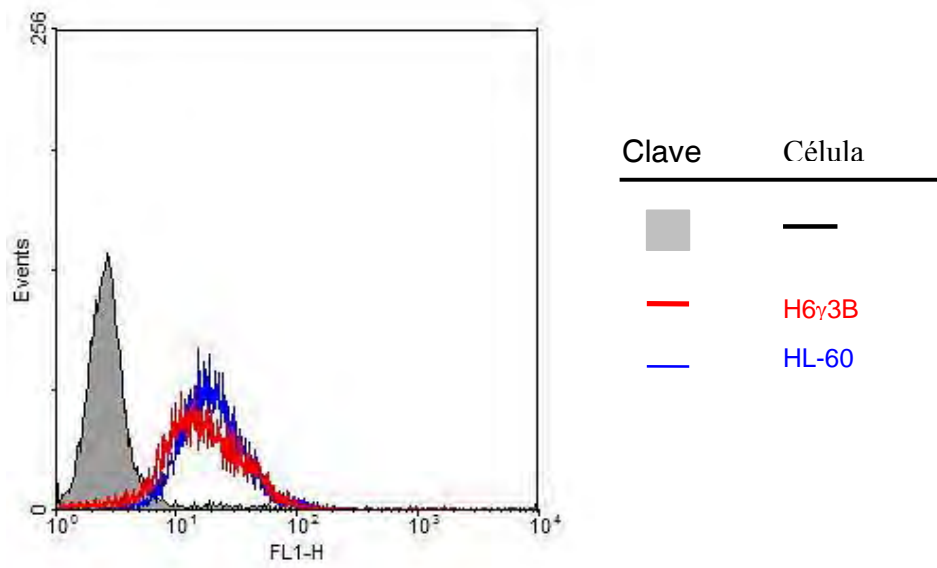


Fig. 11 Tinción para el receptor  $Fc\gamma II A$  con el anticuerpo monoclonal IV.3 en células HL-60 y H6 $\gamma$ 3B. Sin anticuerpo (gris), células H6 $\gamma$ 3B (línea roja) y células HL-60 (línea azul).

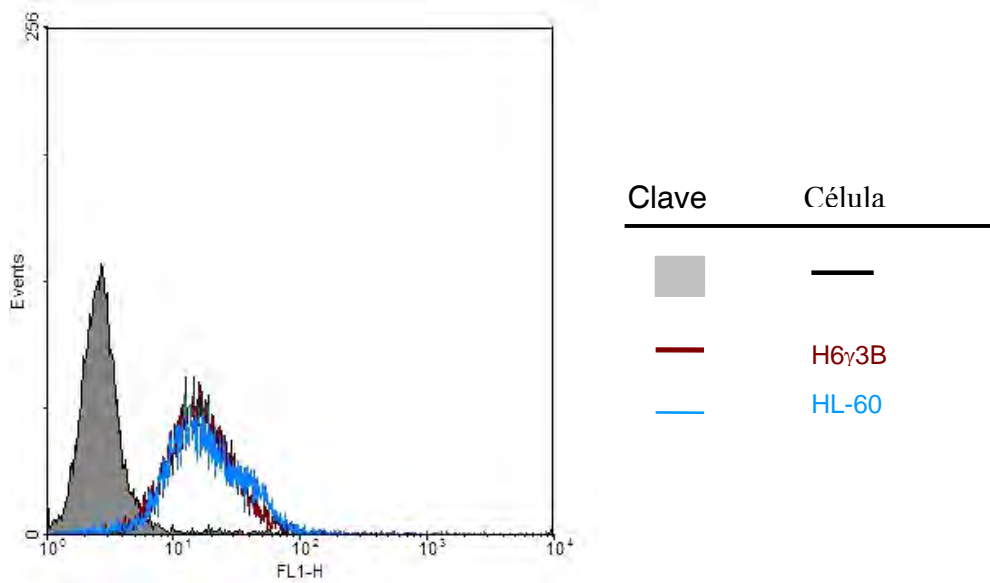


Fig. 12 Tinción para la integrina  $\beta_1$  con el anticuerpo monoclonal TS2/16 en células HL-60 y H6 $\gamma$ 3B. Sin anticuerpo (gris), células H6 $\gamma$ 3B (línea roja oscura) y células HL-60 (línea azul).

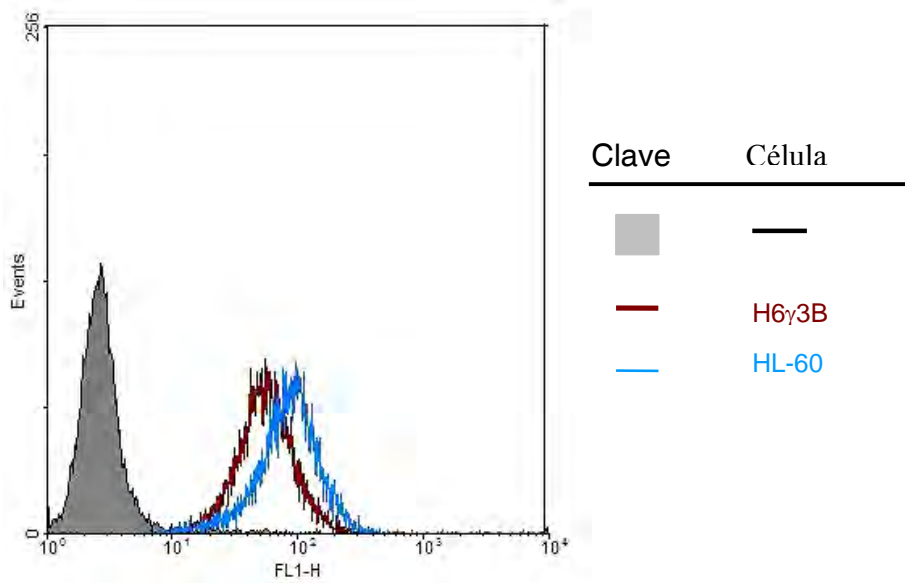


Fig. 13 Tinción para la integrina  $\beta_2$  con el anticuerpo monoclonal IB4 en células HL-60 y H6 $\gamma$ 3B. Sin anticuerpo (gris), células H6 $\gamma$ 3B (línea roja oscura) y células HL-60 (línea azul).

También se determinó la expresión de los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB en las células H6 $\gamma$ 3B después de ser diferenciadas a neutrófilos con DMSO por 6 días. La expresión del receptor Fc $\gamma$ RIIA aumenta en las células H6 $\gamma$ 3B diferenciadas a neutrófilo (Figura 14). Sin embargo, la expresión del receptor Fc $\gamma$ RIIIB no aumenta después de que las células son diferenciadas a neutrófilos con DMSO (Figura 15).

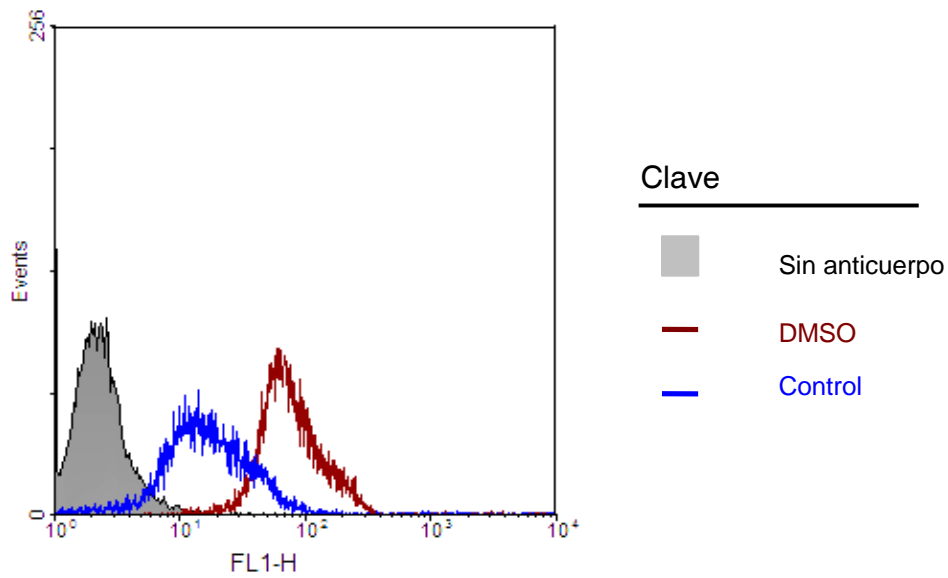


Fig. 14 Tinción del receptor  $Fc\gamma RIIA$  en células  $H6\gamma 3B$  diferenciadas a neutrófilos con DMSO. Células  $H6\gamma 3B$  sin tratar (línea azul) o con DMSO (línea rojo oscuro) por 6 días y se tiñeron con el mAb IV.3 específico para el receptor  $Fc\gamma RIIA$ . Cuadro gris es el control de tinción sin anticuerpo.

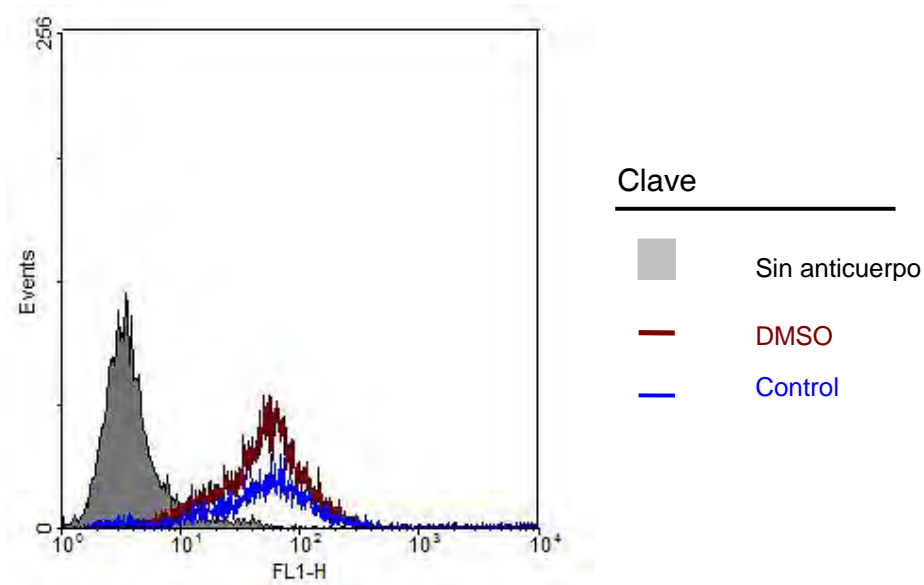


Fig. 15 Tinción del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  en células  $H6\gamma 3B$  diferenciadas a neutrófilos con DMSO. Células  $H6\gamma 3B$  sin tratar (línea azul) o con DMSO (línea roja oscura) por 6 días y se tiñeron con el mAb 3G8 específico para el receptor  $Fc\gamma RIIIB$ . Cuadro gris es el control de tinción sin anticuerpo.

La expresión de las integrinas  $\beta_1$  aumentó considerablemente cuando las células se diferenciaron a neutrófilos (Figura 16). Por su parte las integrinas  $\beta_2$  aumentaron ligeramente su expresión en las células H6 $\gamma$ 3B diferenciadas a neutrófilos (Figura 17)

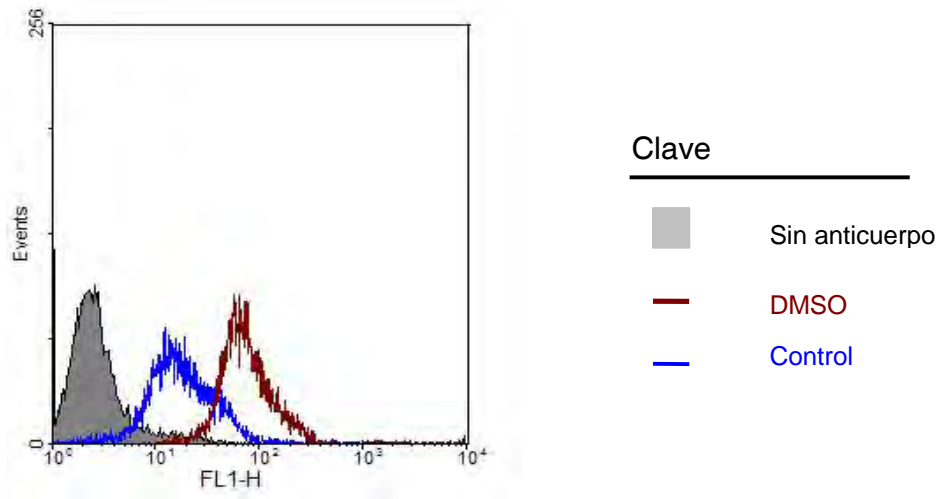


Fig. 16 Tinción integrinas  $\beta_1$  en células H6 $\gamma$ 3B diferenciadas a neutrófilos con DMSO. Células H6 $\gamma$ 3B sin tratar (línea azul) o con DMSO (línea roja oscura) por 6 días y se tiñeron con el mAb TS2/16 específico para integrinas  $\beta_1$ . Cuadro gris es el control de tinción sin anticuerpo.

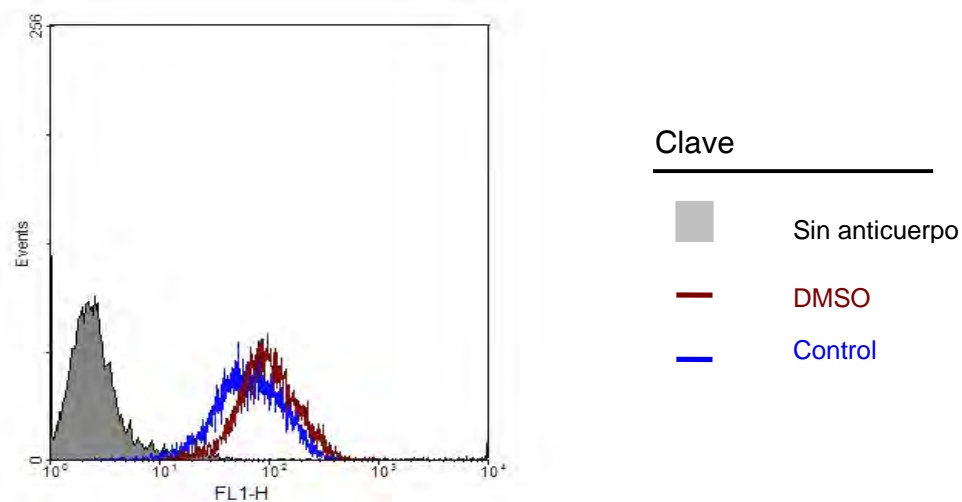


Fig. 17 Tinción integrinas  $\beta_2$  en células H6 $\gamma$ 3B diferenciadas a neutrófilos con DMSO. Células H6 $\gamma$ 3B sin tratar (línea azul) o con DMSO (línea roja oscura) por 6 días y se tiñeron con el mAb IB4 específico para integrinas  $\beta_2$ . Cuadro gris es el control de tinción sin anticuerpo.

Estos datos indicaron que la expresión del receptor  $Fc\gamma RIIA$  y las integrinas  $\beta_1$  y  $\beta_2$  no es afectada por la expresión del receptor  $Fc\gamma RIIB$ ; y que las células H6 $\gamma$ 3B se comportan en forma similar a las células HL-60 cuando son diferenciadas a neutrófilos con DMSO.

### 9.5 Movilización de calcio intracelular en la línea celular H6 $\gamma$ 3B

Los primeros estudios para ver la función del receptor  $Fc\gamma RIIB$  en la línea celular H6 $\gamma$ 3B fueron la medición de la liberación de calcio por el entrecruzamiento del receptor  $Fc\gamma RIIB$ . Se ha reportado que este receptor es capaz de movilizar calcio en neutrófilos cuando es entrecruzado [8,11]. Para mostrar la capacidad de los receptores  $Fc\gamma R$  de inducir la movilización de calcio se utilizaron neutrófilos como control. En la figura 18 podemos ver la movilización de calcio por el entrecruzamiento del receptor  $Fc\gamma RIIA$  en neutrófilos.

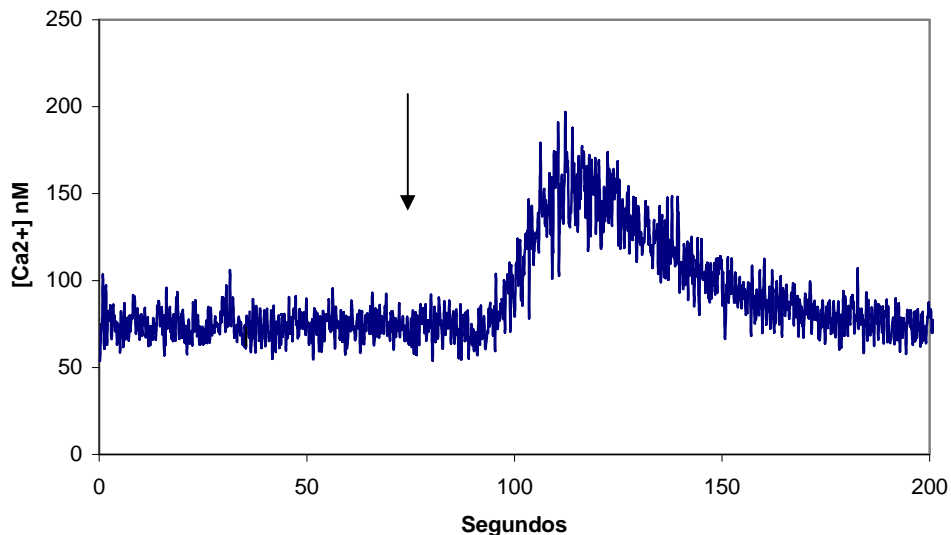


Fig.18 Medición de la liberación de calcio intracelular después del entrecruzamiento del receptor  $Fc\gamma RIIA$  en neutrófilos, realizado por espectrometría de fluorescencia. La flecha indica el momento de entrecruzar el receptor

Al igual que para el receptor  $Fc\gamma RIIA$ , se ha reportado la movilización de calcio inducida por el receptor  $Fc\gamma RIIIB$ . En el laboratorio, se confirmó que el entrecruzamiento del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  en el neutrófilo induce también la movilización de calcio (Figura 19).

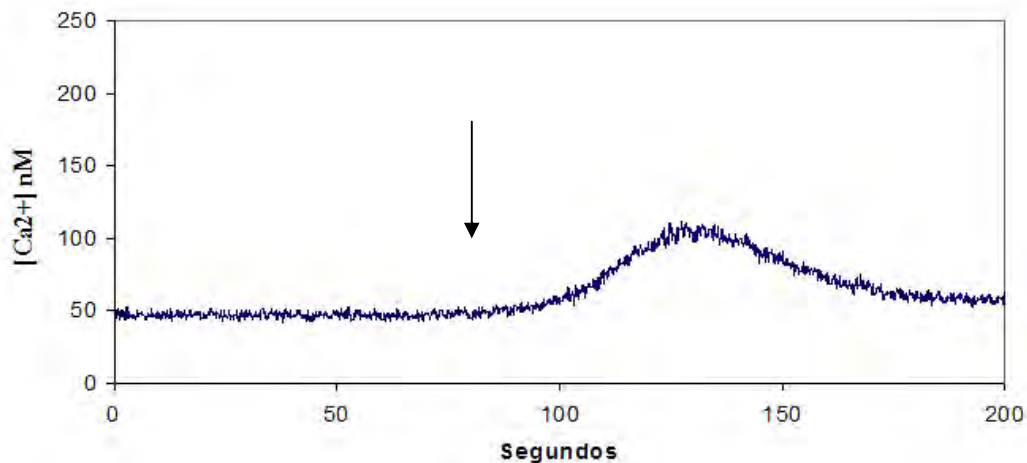


Fig.19 Medición de la liberación de calcio intracelular después del entrecruzamiento del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  en neutrófilos, realizado por espectrometría de fluorescencia. La flecha indica el momento de entrecruzar el receptor.

Después de confirmar que los receptores  $Fc\gamma R$  del neutrófilo pueden movilizar calcio intracelular, quisimos ver si en las células H6 $\gamma$ 3B los receptores  $Fc\gamma R$  también eran capaces de llevar a cabo la movilización de calcio intracelular. Ni el receptor  $Fc\gamma RIIA$  (Figura 20), ni el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  (Figura 21) fueron capaces de movilizar de calcio en las células H6 $\gamma$ 3B.



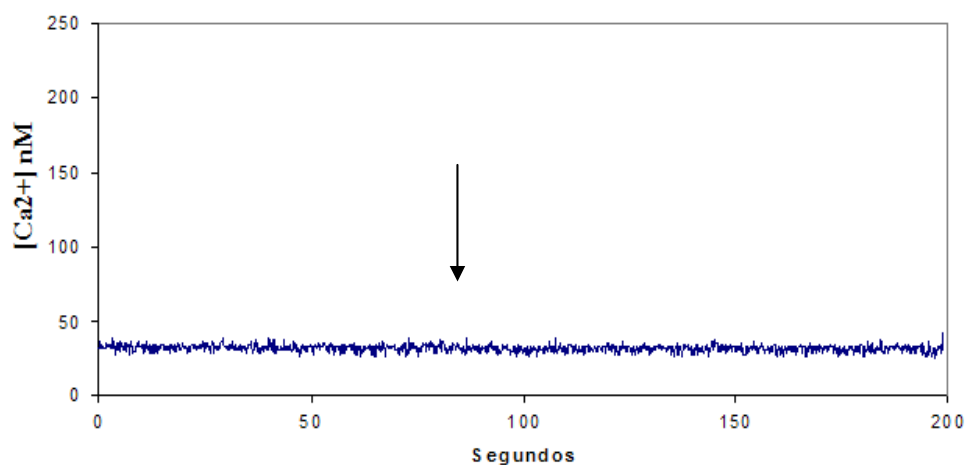


Fig.20 Medición de la liberación de calcio intracelular en células H6 $\gamma$ 3B, después del entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIA, realizado por espectrometría de fluorescencia. La flecha indica el momento de entrecruzar el receptor.

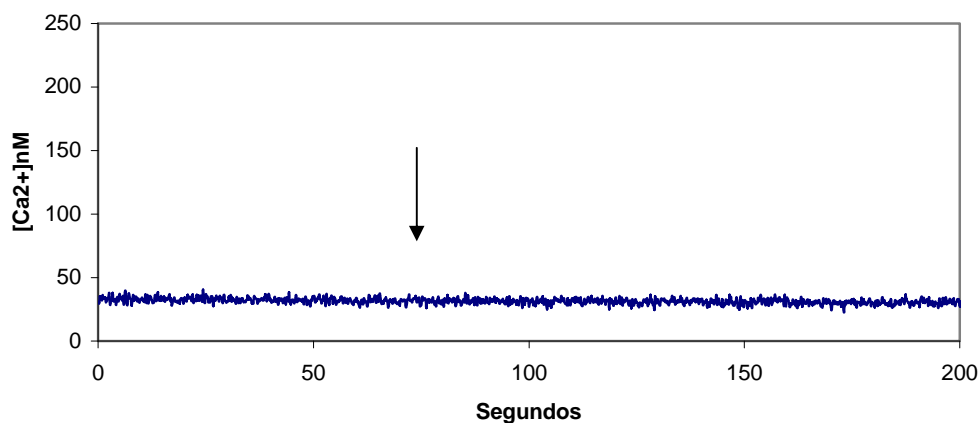


Fig.21 Medición de la liberación de calcio intracelular en células H6 $\gamma$ 3B, después del entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIB, realizado por espectrometría de fluorescencia. La flecha indica el momento de entrecruzar el receptor.

Pensando que las células H6 $\gamma$ 3B no estuvieran internalizando el indicador de calcio Fura 2/AM y por tal motivo no se estuviera detectando el cambio en la concentración intracelular de calcio, se decidió utilizar un control que mostrara que las células estuvieran cargadas con el Fura 2/AM. Para ello se utilizó la ionomicina

que transporta iones calcio a través de la membrana celular. En la figura 22 se muestra la elevación de calcio después de agregar ionomicina, a las células H6 $\gamma$ 3B.

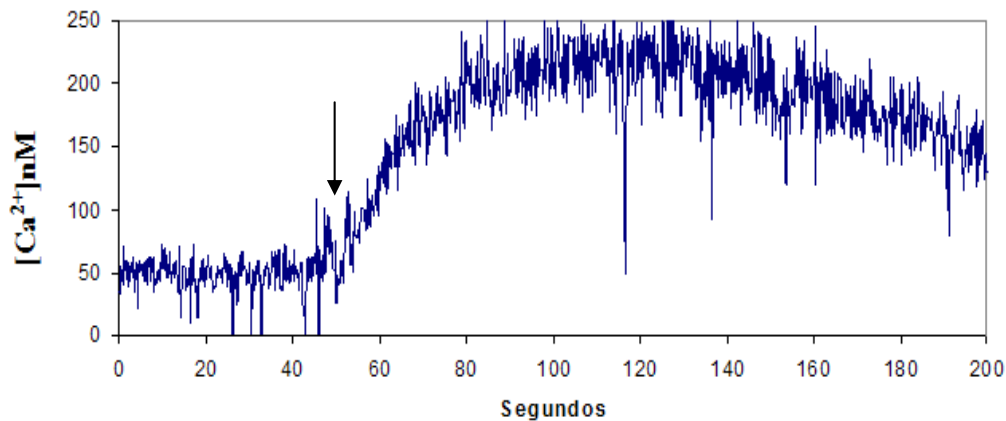


Fig.22 Medición de la liberación de calcio intracelular en células H6 $\gamma$ 3B, después de agregar 50 nM de ionomicina, realizado por espectrometría de fluorescencia. La flecha indica el momento añadir ionomicina.

### **9.6 Movilización de calcio intracelular en células H6 $\gamma$ 3B diferenciadas, después del entrecruzamiento de los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB.**

El resultado anterior confirmó que las células H6 $\gamma$ 3B sí estaban internalizando el Fura 2/AM y los cambios en la concentración intracelular de calcio podían detectarse sin problema. La falta de movilización de calcio después del entrecruzamiento de los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB en las células H6 $\gamma$ 3B podría deberse más bien a la inmadurez de las células. Así que se decidió probar sí diferenciando la células H6 $\gamma$ 3B a neutrófilos con DMSO, las células eran capaces de llevar a cabo la movilización de calcio a través de los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB. Después de que las células H6 $\gamma$ 3B se diferenciaron a

neutrófilos con DMSO se probó que fueran capaces de movilizar calcio. Para esto se utilizó como control la movilización de calcio del receptor para fMLP. El fMLP es un péptido derivado de bacterias que se une a un receptor en los neutrófilos, la unión de fMLP con su receptor induce la movilización de calcio [47].

La figura 23 muestra que el fMLP no fue capaz de llevar a cabo la movilización de calcio intracelular en células H6 $\gamma$ 3B sin diferenciar. Sin embargo, la diferenciación a neutrófilos con DMSO, hace que las células H6 $\gamma$ 3B sí respondan a fMLP con una movilización de calcio (Figura 24).

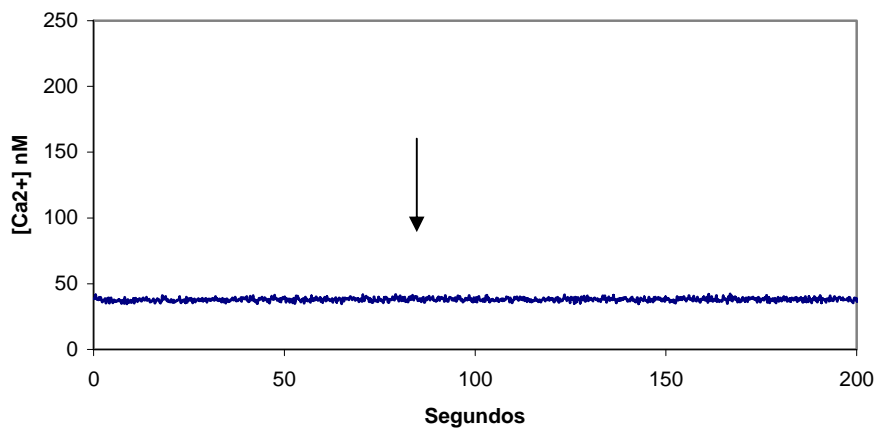


Fig.23 Medición de la liberación de calcio intracelular después de añadir fMLP 20 nM a células H6 $\gamma$ 3B sin diferenciar, realizado por espectrometría de fluorescencia. La flecha indica el momento de añadir fMLP.

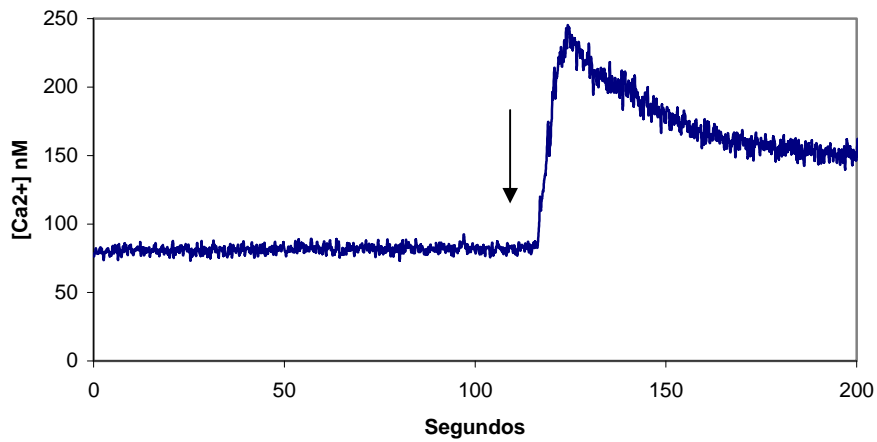


Fig.24 Medición de la liberación de calcio intracelular después de añadir fMLP a 20 nM a células H6 $\gamma$ 3B diferenciadas, realizado por espectrometría de fluorescencia. La flecha indica el momento de añadir fMLP.

Todos estos resultados en conjunto demuestran que las células H6 $\gamma$ 3B diferenciadas con DMSO se comportan efectivamente como neutrófilos y son capaces de llevar a cabo la movilización de calcio intracelular.

El entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIA en células H6 $\gamma$ 3B diferenciadas a neutrófilos indujo la movilización de calcio intracelular (Figura 25). Sin embargo el entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIIB en las células H6 $\gamma$ 3B diferenciadas a neutrófilos no indujo la movilización de calcio intracelular (Figura 26).

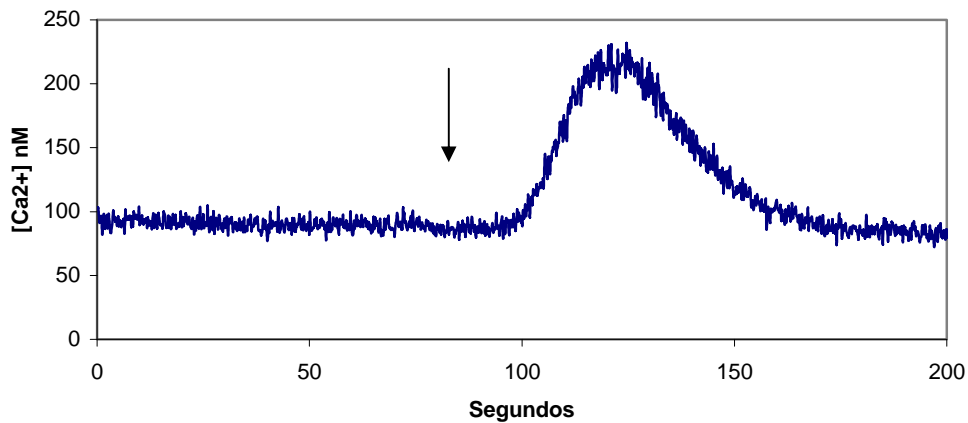


Fig.25 Medición de la liberación de calcio intracelular después del entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIA en células H6 $\gamma$ 3B diferenciadas a neutrófilos, realizado por espectrometría de fluorescencia. La flecha indica el momento de entrecruzar el receptor.

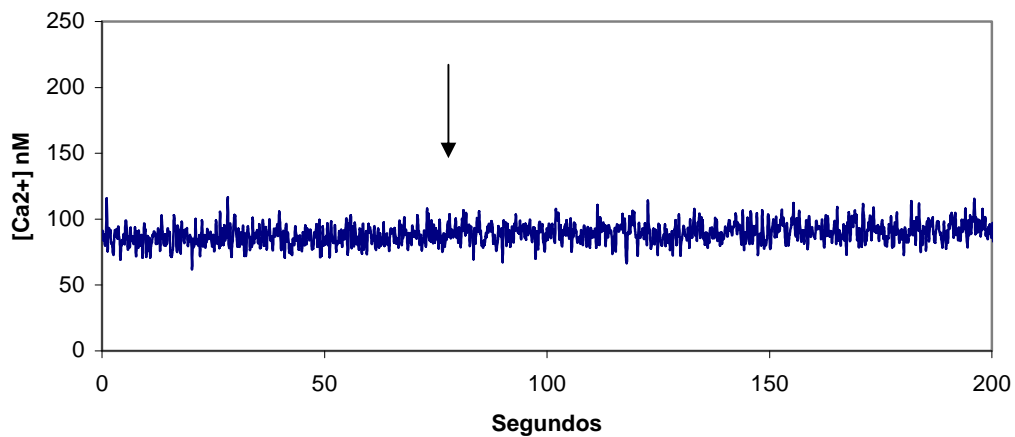


Fig.26 Medición de la liberación de calcio intracelular después del entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIIB en células H6 $\gamma$ 3B diferenciadas a neutrófilos, realizado por espectrometría de fluorescencia. La flecha indica el momento de entrecruzar el receptor.

Estos resultados muestran que las células H6 $\gamma$ 3B son capaces de llevar a cabo la movilización de calcio a través del receptor Fc $\gamma$ RIIA, pero no a través del receptor Fc $\gamma$ RIIIB. Esto pudiera deberse a que el receptor Fc $\gamma$ RIIIB transfectado y expresado en éstas células tiene algún defecto, o bien a que las células H6 $\gamma$ 3B

carecen de algún componente importante para la transducción de señal por este receptor, que se encuentra en el neutrófilo.

### 9.7 Medición de p-ERK por Western Blot.

Antes de descartar completamente que el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  en las células  $H6\gamma 3B$  no era funcional, se decidió medir otra respuesta conocida de este receptor en neutrófilos. Se sabe que el entrecruzamiento del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  lleva a la activación de ERK en el neutrófilo [10,35] y esta activación es además importante para la fagocitosis de partículas opsonizadas por anticuerpos en neutrófilos [10,35].

El primer paso a realizar fue detectar la presencia de la cinasa ERK en la línea celular  $H6\gamma 3B$ . En la figura 27 se muestra la presencia de ERK en neutrófilos y en las células  $H6\gamma 3B$ , detectada por Western blot.

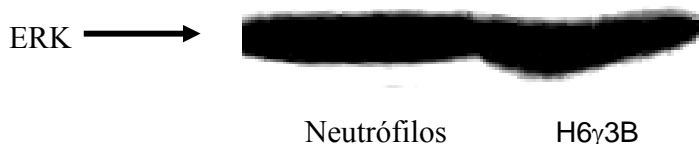


Fig. 27 Expresión de ERK en neutrófilos y en la línea celular  $H6\gamma 3B$ . La detección de ERK se realizó por Western Blot.

Una vez que se comprobó la presencia de la cinasa ERK en la línea celular  $H6\gamma 3B$ , el siguiente paso fue determinar si el entrecruzamiento del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  era capaz de activar a la cinasa ERK en esta línea celular. Para esto se llevó a cabo la detección de la forma fosforilada (activa) de la cinasa, utilizando un anticuerpo específico. En la figura 28 se muestra la activación de la cinasa ERK

después de entrecruzar los receptores  $Fc\gamma RIIA$  y  $Fc\gamma RIIIB$  en neutrófilos y en las células  $H6\gamma 3B$  diferenciadas 6 días con DMSO

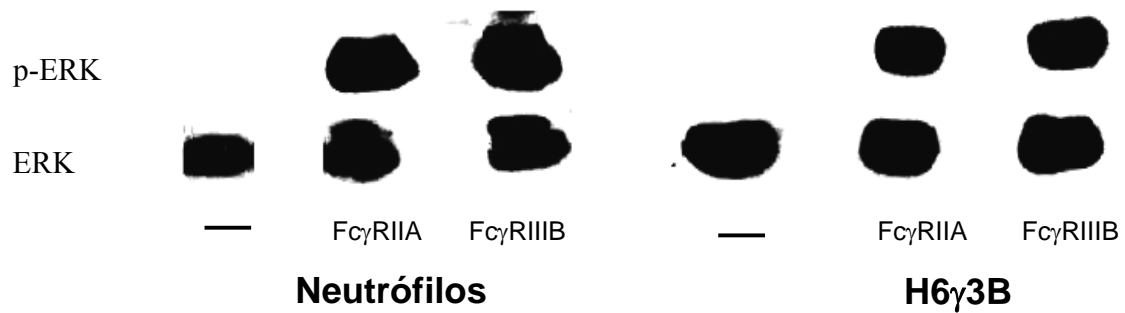


Fig. 28 Activación de la cinasa ERK en neutrófilos y en la línea células  $H6\gamma 3B$  diferenciada a neutrófilos con DMSO por 6 días. Los receptores  $Fc\gamma RIIA$  y  $Fc\gamma RIIIB$  se entrecruzaron con los anticuerpos monoclonales IV.3 y 3G8 respectivamente en neutrófilos y en células  $H6\gamma 3B$ . Posteriormente las células se lisaron y la forma activa fosforilada de ERK (p-ERK) se detectó por Western Blot. El panel inferior muestra que la cantidad total de ERK (detectada por Western blot) en todas las muestras es similar.

Los resultados en conjunto indican que el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  expresado en las células  $H6\gamma 3B$  es capaz de iniciar una vía de señalización que activa a la cinasa ERK, pero no es capaz de inducir la movilización de calcio intracelular.

## 10. Discusión

Los neutrófilos representan la primera línea de defensa contra agentes patógenos. Los neutrófilos son activados al entrar en contacto con antígenos del agente patógeno a través de los receptores presentes en la superficie de su membrana ó bien a través de moléculas producidas por el organismo como las inmunoglobulinas (anticuerpos) en forma de complejos inmunes. Las inmunoglobulinas son reconocidas a través de su porción Fc por los receptores Fc (FcR). Entre estos receptores se encuentran los que reconocen a la inmunoglobulina G (IgG) llamados receptores Fc $\gamma$ R. En el neutrófilo se expresan los receptores Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIB de manera constitutiva. Las funciones del receptor Fc $\gamma$ RIIA han sido descritas en distintas células fagocíticas incluyendo a los neutrófilos, los monocitos y los macrófagos [9]. Sin embargo, a la fecha las funciones del receptor Fc $\gamma$ RIIIB no son completamente comprendidas. Existen diversos reportes que muestran la capacidad del receptor Fc $\gamma$ RIIIB de señalizar al interior de la célula [13,16,17,36-38]. El estudio de la vía de señalización del receptor Fc $\gamma$ RIIIB se ha visto obstaculizado por el hecho de que es un receptor exclusivo del neutrófilo, el cual es una célula de vida media corta. Además que no existe a la fecha un método de transfección eficiente para el neutrófilo que permita realizar experimentos de biología molecular con el fin de aclarar la vía de señalización del Fc $\gamma$ RIIIB. Por este motivo se decidió expresar el receptor Fc $\gamma$ RIIIB en una línea celular que ofrece la ventaja de que puede ser mantenida en cultivo, además de que existen diversos métodos de transfección para distintas líneas celulares.



Un paso importante era establecer la línea celular que se transfectaría con el plásmido pcDNA3 conteniendo el cDNA que codifica para el receptor Fc $\gamma$ RIIIB. Ya hay reportes de que el receptor Fc $\gamma$ RIIIB transfectado en las líneas celulares Jurkat (células T), P815 (células cebadas) y CHO (fibroblastos) no fue capaz de señalizar al interior de estas células [48]. Por este motivo se decidió utilizar una línea celular con características parecidas al neutrófilo. La línea celular HL-60 obtenida de un paciente con leucemia promielocítica [41] se ha utilizado como una célula modelo para estudiar las funciones del neutrófilo [49]. El tratamiento de las células HL-60 con DMSO puede diferenciarlas a neutrófilos [40-42]. También se ha reportado que el tratamiento de las células HL-60 con PMA ó vitamina D3 diferencia a las células hacia monocitos [44,50]. Recientemente se reportó que el tratamiento de las células HL-60 con DMSO modifica la expresión de distintas proteínas en la superficie de la membrana. Sin embargo, aún después del tratamiento con DMSO, no hay expresión del receptor Fc $\gamma$ RIIIB en las células HL-60 [42]. Mis resultados concuerdan con este reporte ya que también indican que las células HL-60 no expresan al Fc $\gamma$ RIIIB aún después de diferenciarlas a neutrófilos (fig.6). No obstante, se ha reportado que el aumento en la expresión del receptor Fc $\gamma$ RIIA es un marcador que indica que las células HL-60 se han diferenciado a neutrófilos [51], al igual que el aumento en la expresión de las integrinas  $\beta_1$  y  $\beta_2$  [42].

Una vez que se observó la ausencia del receptor Fc $\gamma$ RIIIB, lo siguiente fue encontrar un método de transfección para la línea celular HL-60. En este proceso se probaron tres métodos distintos de transfección. El primer método que se utilizó

fue el método de DEAE-DEXTRAN. En este método, el DEAE-DEXTRAN se une por carga a los grupos fosfato del DNA formando agregados. Estos agregados posteriormente se unen a la membrana plasmática en donde son endocitados por la célula permitiendo de esta manera la entrada del DNA al interior de la célula. Aunque no hay reportes de transfección de células HL-60 por este método, se ha reportado que distintas líneas celulares en suspensión son transfectadas por este método [52]. Sin embargo, como lo muestran mis resultados (fig. 8), no se logró la transfección de las células HL-60 por el método de DEAE-DEXTRAN. Así que el siguiente método que se utilizó fue la transfección con lipofectamina. En este método, la lipofectamina forma liposomas dentro de los cuales se encuentra el DNA. Posteriormente estos liposomas se fusionan con la membrana de la célula permitiendo la entrada de DNA. Se ha reportado que las células HL-60 pueden ser transfectadas con lipofectamina [53-55]. Sin embargo, mis resultados muestran lo contrario, ya que las células HL-60 no pudieron ser transfectadas por el método de la lipofectamina (fig.8).

Por último se probó transfectar las células HL-60 por electroporación. Se ha reportado que este método es eficaz para transfectar esta línea celular [56-58]. En este método se proporciona una descarga eléctrica a las células con el fin de hacer poros en la membrana celular y de esta forma permitir la entrada del DNA a la célula. La electroporación es un método eficaz de transfección para una gran cantidad de líneas celulares. Sin embargo, este método resulta muy agresivo para las células, es por ello que se necesita una gran cantidad de ellas para lograr una transfección positiva, ya que sólo entre 20 % y 30 % de las células logra sobrevivir. La transfección de las células HL-60 por electroporación fue positiva

como lo demostró la expresión de luciferasa, después de transfectar las células con el plásmido pGL3c que codifica para la enzima luciferasa (fig 8). Después de comprobar que las células HL-60 se pueden transfectar por electroporación, se procedió a transfectar las células con el plásmido pcDNA3/Fc $\gamma$ RIIIB. Este plásmido también tiene un gen que le proporciona a la célula resistencia contra el antibiótico geneticina. La resistencia contra este antibiótico nos permitió eliminar todas aquellas células que no fueron transfectadas, debido a que la geneticina interfiere en la síntesis de proteínas en células eucarióticas y sólo aquellas células que fueron transfectadas con el plásmido pcDNA3/Fc $\gamma$ RIIIB puede sobrevivir. Después de tratar a las células HL-60 por varios días con geneticina a una concentración de 800  $\mu$ g/ml se tenían dos poblaciones de células expresando diferentes cantidades del receptor (fig. 9). Por lo tanto se realizó entonces una selección de células positivas por citometría de flujo para obtener una población homogénea de células que expresaran al receptor Fc $\gamma$ RIIIB. Después de separar las células que expresaban una mayor cantidad del receptor se obtuvo una línea celular que expresa al receptor Fc $\gamma$ RIIIB de manera estable. Esta línea celular se denominó H6 $\gamma$ 3B (fig.10). Teniendo la línea celular que expresa Fc $\gamma$ RIIIB se procedió a estudiar la capacidad de señalizar de este receptor en estas células

Los primeros estudios realizados en las células H6 $\gamma$ 3B fueron la movilización de calcio por el entrecruzamiento de receptor Fc $\gamma$ RIIIB. La capacidad de liberar calcio intracelular por parte del receptor Fc $\gamma$ RIIIB en el neutrófilo ha sido mostrada por distintos grupos de trabajo [8,11,16]. Pero a la fecha, la vía de señalización que induce la liberación de calcio en respuesta al entrecruzamiento

del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  no se comprende con claridad. Se ha reportado que la liberación de calcio intracelular inducida por el entrecruzamiento del receptor  $Fc\gamma RIIIB$  es independiente de  $IP_3$  [21]. Al contrario, la liberación de calcio inducida por el receptor  $Fc\gamma RIIA$  y por el receptor para fMLP es dependiente de  $IP_3$  [18,21,59]. Para entender cuál es la vía de señalización que utiliza el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  para inducir la liberación de calcio, el receptor ha sido expresado en distintas líneas celulares incluyendo células T Jurkat, en células cebadas P815 y en células CHO que tienen características de fibroblastos. En estas líneas celulares el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  fue incapaz de inducir la liberación de calcio después de su entrecruzamiento [48]. Mis resultados también muestran que el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  expresado en la línea celular HL-60 no fue capaz de inducir la liberación de calcio (fig. 18). Esto se mantuvo aún cuando las células fueron diferenciadas con DMSO a neutrófilos (fig. 22). Este resultado no es porque las células tengan un defecto en su maquinaria para movilizar calcio. Cuando el receptor  $Fc\gamma RIIA$  en esta misma línea celular es entrecruzado se produce una liberación de calcio normal (fig. 21). De igual manera el receptor para fMLP induce liberación de calcio en las células H6 $\gamma$ 3B (fig. 20). El receptor  $Fc\gamma RIIIB$  no indujo la liberación de calcio aún cuando las células H6 $\gamma$ 3B fueron diferenciadas con DMSO.

El hecho de que el receptor  $Fc\gamma RIIIB$  transfectado en las células HL-60 no pueda movilizar calcio, al igual que no lo puede hacer en las células Jurkat y CHO [48], sugiere que la vía de señalización de este receptor involucra alguna molécula que sólo se acopla funcionalmente a este receptor en el neutrófilo.

Por otra parte se ha reportado que el receptor Fc $\gamma$ RIIIB puede activar a la cinasa ERK [10,17]. ERK participa en la fagocitosis mediada por partículas opsonizadas con IgG en neutrófilos [60,61]. Estas células requieren de ERK y PI3K para una fagocitosis eficiente [35]. A diferencia de la movilización de calcio, mis resultados muestran que el receptor Fc $\gamma$ RIIIB es capaz de activar a la cinasa ERK, al igual que lo hace el receptor Fc $\gamma$ RIIA (fig.24). Estos datos muestran que el receptor Fc $\gamma$ RIIIB transfectado en las células HL-60 sí es funcional, al menos para enviar algunas señales al interior de la célula. Sin embargo, falta por aclarar la vía de señalización que utiliza el receptor Fc $\gamma$ RIIIB.

Aunque las vía que lleva a la activación de ERK y liberación de calcio inducidas por el entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIIB no son del todo claras, se ha reportado que otras proteínas ancladas con moléculas de glicosilfosfatidilinositol son capaces de enviar señales al interior de la célula. Una característica en común que tienen las proteínas ancladas con GPI es que después de su unión con su ligando, estas proteínas son capaces de enviar señales al interior de la célula que resultan en: la elevación de calcio intracelular, fosforilación de tirosinas de substratos celulares, iniciación de funciones efectoras como el estallido oxidativo, o degranulación, e incluso proliferación como en el caso de las células T [62]. El entrecruzamiento de proteínas acopladas a GPI como Thy-1, la proteína activadora de células T (TAP) o el factor acelerador de decaimiento de complemento (DAF) llevan a la activación de células T, produciendo la liberación de calcio intracelular, la producción de IL-2 y la proliferación celular [9].

Se han identificado cinasas de la familia Src como Lck en asociación con proteínas ancladas con GPI como DAF y Thy-1. Las interacciones entre las cinasas de la familia Src y las proteínas acopladas a GPI están en los sitios de palmitoilación de la región amino terminal de la cinasa [63,64]. Tanto las cinasas de la familia Src, como las proteínas ancladas con moléculas de GPI se encuentran en regiones de la membrana ricas en glicofosfolípidos y colesterol. Estas regiones se conocen como membranas resistentes a detergentes (DRM, por sus siglas en inglés). Las DRM se comportan como plataformas dentro de las cuales se forman complejos de proteínas capaces de enviar señales al interior de la célula. Recientemente se reportó que las DRM están divididas en las DRM de alta densidad (DRM-H) y las DRM de baja densidad (DRM-L) [6]. Se piensa que el receptor Fc $\gamma$ RIIIB está en las DRM-L en estado de reposo y una vez que es entrecruzado, se concentra en las DRM-H. Esto es porque se ha reportado que en las DRM-H hay una gran cantidad de proteínas asociadas al citoesqueleto [65]. Esto sugeriría que la asociación del receptor Fc $\gamma$ RIIIB con las DRM-H podría estar implicada en el proceso de polimerización de la actina, que es iniciado por el entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIIB [65].

En los DRMs también se ha reportado la presencia de otras moléculas como las integrinas  $\beta_2$  [6] y el receptor Fc $\gamma$ RIIA [59]. La cercanía del receptor Fc $\gamma$ RIIIB con estas moléculas apoyaría la idea de que este receptor necesita asociarse a estas moléculas para señalizar al interior de la célula. El estudio de la asociación del receptor Fc $\gamma$ RIIIB con otras moléculas se ha visto obstaculizado por el hecho de ser éste un receptor exclusivo del neutrófilo. Los estudios para

determinar si existe una asociación real entre el receptor Fc $\gamma$ RIIIB y otras moléculas como integrinas ó el receptor Fc $\gamma$ RIIA se han realizado por microscopia de fluorescencia [13]. Se ha reportado co-localización de fluorescencia para el Fc $\gamma$ RIIIB y las integrinas  $\beta_2$  o el Fc $\gamma$ RIIA, después de la activación con complejos inmunes. Sin embargo, aún queda en duda si la co-localización refleja una asociación real (directa proteína-proteína) entre estas moléculas. Un estudio por transferencia de energía de fluorescencia por resonancia (FRET) que podría resolver este problema, aún no es posible de realizar, debido a que no existe un método eficiente de transfección para el neutrófilo. No obstante ahora que contamos con una línea celular que expresa al receptor Fc $\gamma$ RIIIB que es capaz de activar a ERK, se podría empezar a dilucidar la vía de señalización que utiliza el receptor Fc $\gamma$ RIIIB utilizando otras técnicas como la transfección de moléculas marcadas con proteína verde fluorescente ó de moléculas mutadas.

Aún faltan realizar estudios complementarios sobre el receptor Fc $\gamma$ RIIIB expresado en la línea H6 $\gamma$ 3B para ver si el receptor puede aumentar la expresión de las integrinas  $\beta_2$ , ó si puede activar a las integrinas  $\beta_1$ , tal como se ha reportado que lo hace en neutrófilos [14]. También falta comprobar que el receptor Fc $\gamma$ RIIIB en las células H6 $\gamma$ 3B tiene la capacidad de inducir fagocitosis. Se sabe que las células HL-60 son capaces de fagocitar una vez que han sido diferenciadas con DMSO a neutrófilos [44,66]. En estas condiciones hay que probar al receptor Fc $\gamma$ RIIIB en las células H6 $\gamma$ 3B. Finalmente otra prueba a realizar con estas células es ver la participación del receptor Fc $\gamma$ RIIIB en la activación de factores

transcripcionales como NF $\kappa$ B como se mostró que lo puede hacer en el neutrófilo [17].

Aunque aún faltan estudiar otras funciones que pueda tener el receptor Fc $\gamma$ RIIIB en las células H6 $\gamma$ 3B, el contar con esta línea celular nos ayudará en el futuro a esclarecer la vía de señalización del receptor Fc $\gamma$ RIIIB.



## 11. Conclusiones

- La activación del receptor Fc $\gamma$ RIIA y el receptor para fMLP induce la movilización de Calcio intracelular solamente en las células H6 $\gamma$ 3B diferenciadas a neutrófilos. Las células H6 $\gamma$ 3B diferenciadas no pueden llevar a cabo la movilización de calcio por el receptor Fc $\gamma$ RIIIB.
- El entrecruzamiento del receptor Fc $\gamma$ RIIIB es capaz de activar a la cinasa ERK en las células H6 $\gamma$ 3B diferenciadas a neutrófilos.
- El receptor Fc $\gamma$ RIIIB es funcional en las células H6 $\gamma$ 3B.
- Las células H6 $\gamma$ 3B servirán para estudios posteriores sobre la vía de señalización del receptor Fc $\gamma$ RIIIB.

## 12. Referencias

- [1] Garcia-Garcia E, Rosales C. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 2002;72:1092-1108.
- [2] Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2001;19:275-290.
- [3] Sanchez-Mejorada G, Rosales C. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leukoc Biol* 1998;63:521-533.
- [4] Ravetch JV, Perussia B. Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med* 1989;170:481-497.
- [5] Kobayashi SD, Voyich JM, DeLeo FR. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect* 2003;5:1337-1344.
- [6] Fernandes MJ, Rollet-Labelle E, Pare G, Marois S, Tremblay ML, Teillaud JL, Naccache PH. CD16b associates with high-density, detergent-resistant membranes in human neutrophils. *Biochem J* 2006;393:351-359.
- [7] Choi M, Rolle S, Wellner M, Cardoso MC, Scheidereit C, Luft FC, Kettritz R. Inhibition of NF-kappaB by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis. *Blood* 2003;102:2259-2267.
- [8] Kimberly RP, Ahlstrom JW, Click ME, Edberg JC. The glycosyl phosphatidylinositol-linked Fc gamma RIIPMN mediates transmembrane signaling events distinct from Fc gamma RII. *J Exp Med* 1990;171:1239-1255.
- [9] Unkeless JC, Shen Z, Lin CW, DeBeus E. Function of human Fc gamma RIIA and Fc gamma RIIB. *Semin Immunol* 1995;7:37-44.
- [10] Hazan-Halevy I, Seger R, Levy R. The requirement of both extracellular regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase for stimulation of cytosolic phospholipase A(2) activity by either Fc gamma RIIA or Fc gamma RIIB in human neutrophils. A possible role for Pyk2 but not for the Grb2-Sos-Shc complex. *J Biol Chem* 2000;275:12416-12423.
- [11] Zhou MJ, Lublin DM, Link DC, Brown EJ. Distinct tyrosine kinase activation and Triton X-100 insolubility upon Fc gamma RII or Fc gamma RIIB ligation in human polymorphonuclear leukocytes. Implications for immune complex activation of the respiratory burst. *J Biol Chem* 1995;270:13553-13560.
- [12] Salmon JE, Brogle NL, Edberg JC, Kimberly RP. Fc gamma receptor III induces actin polymerization in human neutrophils and primes phagocytosis mediated by Fc gamma receptor II. *J Immunol* 1991;146:997-1004.
- [13] Ortiz-Stern A, Rosales C. Fc gamma RIIB stimulation promotes beta1 integrin activation in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 2005;77:787-799.
- [14] Salmon JE, Kapur S, Kimberly RP. Opsonin-independent ligation of Fc gamma receptors. The 3G8-bearing receptors on neutrophils mediate the phagocytosis of concanavalin A-treated erythrocytes and nonopsonized *Escherichia coli*. *J Exp Med* 1987;166:1798-1813.

- [15] Nagarajan S, Venkiteswaran K, Anderson M, Sayed U, Zhu C, Selvaraj P. Cell-specific, activation-dependent regulation of neutrophil CD32A ligand-binding function. *Blood* 2000;95:1069-1077.
- [16] Fernandes MJ, Lachance G, Pare G, Rollet-Labelle E, Naccache PH. Signaling through CD16b in human neutrophils involves the Tec family of tyrosine kinases. *J Leukoc Biol* 2005;78:524-532.
- [17] Garcia-Garcia E, Rosales C. Nuclear factor activation by Fc $\gamma$ R in human peripheral blood neutrophils detected by a novel flow cytometry-based method. *J Immunol Methods* 2007;320:104-118.
- [18] Garcia-Garcia E, Sanchez-Mejorada G, Rosales C. Phosphatidylinositol 3-kinase and ERK are required for NF- $\kappa$ B activation but not for phagocytosis. *J Leukoc Biol* 2001;70:649-658.
- [19] Zhang G, Ghosh S. Toll-like receptor-mediated NF- $\kappa$ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 2001;107:13-19.
- [20] Kraft S, Novak N, Katoh N, Bieber T, Rupec RA. Aggregation of the high-affinity IgE receptor Fc( $\epsilon$ )RI on human monocytes and dendritic cells induces NF- $\kappa$ B activation. *J Invest Dermatol* 2002;118:830-837.
- [21] Rosales C, Brown EJ. Signal transduction by neutrophil immunoglobulin G Fc receptors. Dissociation of intracytoplasmic calcium concentration rise from inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 1992;267:5265-5271.
- [22] Chuang FY, Sassaroli M, Unkeless JC. Convergence of Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB signaling pathways in human neutrophils. *J Immunol* 2000;164:350-360.
- [23] Anderson CL, Shen L, Eicher DM, Wewers MD, Gill JK. Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes. *J Exp Med* 1990;171:1333-1345.
- [24] Huizinga TW, van Kemenade F, Koenderman L, Dolman KM, von dem Borne AE, Tetteroo PA, Roos D. The 40-kDa Fc gamma receptor (FcRII) on human neutrophils is essential for the IgG-induced respiratory burst and IgG-induced phagocytosis. *J Immunol* 1989;142:2365-2369.
- [25] Hogg N. The structure and function of Fc receptors. *Immunol Today* 1988;9:185-187.
- [26] Vossebeld PJ, Kessler J, von dem Borne AE, Roos D, Verhoeven AJ. Heterotypic Fc gamma R clusters evoke a synergistic Ca<sup>2+</sup> response in human neutrophils. *J Biol Chem* 1995;270:10671-10679.
- [27] Green JM, Schreiber AD, Brown EJ. Role for a glycan phosphoinositol anchor in Fc gamma receptor synergy. *J Cell Biol* 1997;139:1209-1217.
- [28] Edwards SW. Cell signalling by integrins and immunoglobulin receptors in primed neutrophils. *Trends Biochem Sci* 1995;20:362-367.
- [29] Kindzelskii AL, Yang Z, Nabel GJ, Todd RF, 3rd, Petty HR. Ebola virus secretory glycoprotein (sGP) diminishes Fc gamma RIIB-to-CR3 proximity on neutrophils. *J Immunol* 2000;164:953-958.
- [30] Sehgal G, Zhang K, Todd RF, 3rd, Boxer LA, Petty HR. Lectin-like inhibition of immune complex receptor-mediated stimulation of neutrophils. Effects on cytosolic calcium release and superoxide production. *J Immunol* 1993;150:4571-4580.

- [31] Petty HR, Todd RF, 3rd. Integrins as promiscuous signal transduction devices. *Immunol Today* 1996;17:209-212.
- [32] Zhou M, Todd RF, 3rd, van de Winkel JG, Petty HR. Cocapping of the leukoadhesin molecules complement receptor type 3 and lymphocyte function-associated antigen-1 with Fc gamma receptor III on human neutrophils. Possible role of lectin-like interactions. *J Immunol* 1993;150:3030-3041.
- [33] Berton G, Lowell CA. Integrin signalling in neutrophils and macrophages. *Cell Signal* 1999;11:621-635.
- [34] Ortiz-Stern A, Rosales C. Cross-talk between Fc receptors and integrins. *Immunol Lett* 2003;90:137-143.
- [35] Garcia-Garcia E, Rosales R, Rosales C. Phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase are recruited for Fc receptor-mediated phagocytosis during monocyte-to-macrophage differentiation. *J Leukoc Biol* 2002;72:107-114.
- [36] Edberg JC, Moon JJ, Chang DJ, Kimberly RP. Differential regulation of human neutrophil FcgammaRIIa (CD32) and FcgammaRIIIb (CD16)-induced Ca<sup>2+</sup> transients. *J Biol Chem* 1998;273:8071-8079.
- [37] Edberg JC, Salmon JE, Kimberly RP. Functional capacity of Fc gamma receptor III (CD16) on human neutrophils. *Immunol Res* 1992;11:239-251.
- [38] Williams TE, Nagarajan S, Selvaraj P, Zhu C. Concurrent and independent binding of Fcgamma receptors IIa and IIIb to surface-bound IgG. *Biophys J* 2000;79:1867-1875.
- [39] Jones SL, Knaus UG, Bokoch GM, Brown EJ. Two signaling mechanisms for activation of alphaM beta2 avidity in polymorphonuclear neutrophils. *J Biol Chem* 1998;273:10556-10566.
- [40] Carrigan SO, Wepler AL, Issekutz AC, Stadnyk AW. Neutrophil differentiated HL-60 cells model Mac-1 (CD11b/CD18)-independent neutrophil transepithelial migration. *Immunology* 2005;115:108-117.
- [41] Koeffler HP, Golde DW. Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood* 1980;56:344-350.
- [42] Yanagida M, Nakayama H, Yoshizaki F, Fujimura T, Takamori K, Ogawa H, Iwabuchi K. Proteomic analysis of plasma membrane lipid rafts of HL-60 cells. *Proteomics* 2007;7:2398-2409.
- [43] Brechard S, Bueb JL, Tschirhart EJ. Interleukin-8 primes oxidative burst in neutrophil-like HL-60 through changes in cytosolic calcium. *Cell Calcium* 2005;37:531-540.
- [44] Newburger PE, Chovaniec ME, Greenberger JS, Cohen HJ. Functional changes in human leukemic cell line HL-60. A model for myeloid differentiation. *J Cell Biol* 1979;82:315-322.
- [45] Chaplinski TJ, Niedel JE. Cyclic nucleotide-induced maturation of human promyelocytic leukemia cells. *J Clin Invest* 1982;70:953-964.
- [46] Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC. Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. *J Exp Med* 1979;149:969-974.

- [47] Rosales C, Brown EJ. Two mechanisms for IgG Fc-receptor-mediated phagocytosis by human neutrophils. *J Immunol* 1991;146:3937-3944.
- [48] Wirthmueller U, Kurosaki T, Murakami MS, Ravetch JV. Signal transduction by Fc gamma RIII (CD16) is mediated through the gamma chain. *J Exp Med* 1992;175:1381-1390.
- [49] Birnie GD. The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. *Br J Cancer Suppl* 1988;9:41-45.
- [50] Harris P, Ralph P. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leukoc Biol* 1985;37:407-422.
- [51] Jacob C, Leport M, Szilagyi C, Allen JM, Bertrand C, Lagente V. DMSO-treated HL60 cells: a model of neutrophil-like cells mainly expressing PDE4B subtype. *Int Immunopharmacol* 2002;2:1647-1656.
- [52] Schenborn ET, Goiffon V. DEAE-dextran transfection of mammalian cultured cells. *Methods Mol Biol* 2000;130:147-153.
- [53] Antonyak MA, Boehm JE, Cerione RA. Phosphoinositide 3-kinase activity is required for retinoic acid-induced expression and activation of the tissue transglutaminase. *J Biol Chem* 2002;277:14712-14716.
- [54] Chen F, Wang Q, Wang X, Studzinski GP. Up-regulation of Egr1 by 1,25-dihydroxyvitamin D3 contributes to increased expression of p35 activator of cyclin-dependent kinase 5 and consequent onset of the terminal phase of HL60 cell differentiation. *Cancer Res* 2004;64:5425-5433.
- [55] Richards N, Schaner P, Diaz A, Stuckey J, Shelden E, Wadhwa A, Gumucio DL. Interaction between p35 and the apoptotic speck protein (ASP) modulates ASP-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:39320-39329.
- [56] Tee MK, Vigne JL, Taylor RN. All-trans retinoic acid inhibits vascular endothelial growth factor expression in a cell model of neutrophil activation. *Endocrinology* 2006;147:1264-1270.
- [57] Srinivasan S, Wang F, Glavas S, Ott A, Hofmann F, Aktories K, Kalman D, Bourne HR. Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol* 2003;160:375-385.
- [58] Chen L, Smith L, Johnson MR, Wang K, Diasio RB, Smith JB. Activation of protein kinase C induces nuclear translocation of RFX1 and down-regulates c-myc via an intron 1 X box in undifferentiated leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem* 2000;275:32227-32233.
- [59] Garcia-Garcia E, Brown EJ, Rosales C. Transmembrane mutations to Fc gamma RIIA alter its association with lipid rafts: implications for receptor signaling. *J Immunol* 2007;178:3048-3058.
- [60] Suchard SJ, Mansfield PJ, Boxer LA, Shayman JA. Mitogen-activated protein kinase activation during IgG-dependent phagocytosis in human neutrophils: inhibition by ceramide. *J Immunol* 1997;158:4961-4967.
- [61] Mansfield PJ, Shayman JA, Boxer LA. Regulation of polymorphonuclear leukocyte phagocytosis by myosin light chain kinase after activation of mitogen-activated protein kinase. *Blood* 2000;95:2407-2412.
- [62] Horejsi V, Drbal K, Cebecauer M, Cerny J, Brdicka T, Angelisova P, Stockinger H. GPI-microdomains: a role in signalling via immunoreceptors. *Immunol Today* 1999;20:356-361.

- [63] Shenoy-Scaria AM, Gauen LK, Kwong J, Shaw AS, Lublin DM. Palmitoylation of an amino-terminal cysteine motif of protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn mediates interaction with glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol Cell Biol* 1993;13:6385-6392.
- [64] Stefanova I, Horejsi V, Ansotegui IJ, Knapp W, Stockinger H. GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. *Science* 1991;254:1016-1019.
- [65] Nebl T, Pestonjamasp KN, Leszyk JD, Crowley JL, Oh SW, Luna EJ. Proteomic analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes. *J Biol Chem* 2002;277:43399-43409.
- [66] Matzner Y, Gavison R, Rachmilewitz EA, Fibach E. Expression of granulocytic functions by leukemic promyelocytic HL-60 cells: differential induction by dimethylsulfoxide and retinoic acid. *Cell Differ* 1987;21:261-269.
- [67] Rosales C, Fc receptor and integrin signaling in phagocytes. *Signaltrans* 2007;7 : 386-401.