



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DEL PAPEL DE CD13 EN LA
FAGOCITOSIS DE BACTERIAS POR CÉLULAS
MONOCÍTICAS HUMANAS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

MARIANA ZÚÑIGA GARCÍA



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profesor: Raúl Garza Velasco
VOCAL: Profesor: Enrique Ortega Soto
SECRETARIO: Profesor: Ruth Edith Martín Fuentes
1er. SUPLENTE: Profesor: Patricia Elvira Berrón Ruíz
2° SUPLENTE: Profesor: José Cordero Hernández

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología del cual es titular el Dr. Enrique Ortega Soto, perteneciente al Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dr. Enrique Ortega Soto
Asesor

Mariana Zúñiga García
Sustentante

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas con el apoyo económico de CONACYT (proyecto 45092). Recibí una beca otorgada por la Dirección General de Personal Académico, DGAPA, UNAM (proyecto IN222008).

Agradezco a la M. en IBB. Claudia A. Garay Canales por su apoyo técnico a lo largo de todo el trabajo, a la Dra. Leonor Huerta y a la M. en C. Evelyn Rivera Toledo por su apoyo técnico en los experimentos de tinción celular así como a la Dra. Tzipe Govezensky por su apoyo en el análisis estadístico.

Agradezco también al Banco de Sangre del Centro Médico Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social por proporcionarme los concentrados leucocitarios necesarios para el aislamiento de monocitos.

Dedicatorias

Le dedico este trabajo a mis papás, Charis y Tito, porque es gracias a su amor y apoyo que he llegado a convertirme en la persona que soy hoy en día. Todos los logros que he tenido en la vida también han sido de ustedes, este es uno más. Los amo.

A mi abu Charito por haber sido como una segunda mamá durante estos últimos 5 años y por haberme brindado su amor y comprensión como lo hubieran hecho mis propios padres. A mi abu Raúl que donde quiera que esté sé que está muy orgulloso de verme convertida en profesionista.

A mi hermano José Manuel por haber compartido conmigo entre bromas y risas esta última etapa de mi carrera y por siempre estar conmigo.

A mi novio Marco por darme todo su amor y apoyo durante estos últimos 6 años, por ser además mi mejor amigo y haber estado conmigo tanto en las buenas como en las malas, por impulsarme a lograr todo lo que me propongo y no dejarme caer.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme dado la oportunidad de formar parte de ella y decir orgullosamente que soy puma.

A la Facultad de Química por haberme formado como la Q.F.B. que soy hoy en día.

Al Dr. Ortega por haberme dado la oportunidad de formar parte de su Laboratorio y por estar siempre al pendiente del desarrollo de mi trabajo.

A Clau por haber sido también para mí una “madre académica” ...y darme toda su ayuda y consejos durante mi estancia en el lab..

A Natalia, Ileana, Aurora, Linda, Sra. Raquel, Rodrigo y Uriel por los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio.

A todos mis amigos de la Fac, con los que he compartido tantos momentos increíbles estos últimos 5 años y que me han estado apoyando en este último empujón.

Muchas gracias a todos!

ÍNDICE

Introducción	1
--------------------	---

Capítulo I. Marco Teórico

1.1. El sistema inmune.....	3
1.2. El sistema fagocítico mononuclear.....	4
1.2.1. Heterogeneidad en macrófagos.....	6
1.3. Activación y funciones efectoras de macrófagos.....	7
1.3.1. Activación Innata.....	9
1.3.2. Activación clásica.....	9
1.3.3. Activación alterna.....	10
1.3.4. Actividad microbicida de macrófagos.....	10
1.4. Receptores que reconocen microorganismos.....	12
1.5. Fagocitosis.....	14
1.5.1. Modelos de fagocitosis.....	15
1.5.2. La fagocitosis como proceso organizado.....	16
1.6. Fagocitosis mediada por receptores para Fc.....	18
1.6.1. Señalización a través de Fc γ Rs activadores e inhibidores.....	20
1.7. Moléculas reguladoras de señales.....	21
1.8. CD13 (aminopeptidasa N).....	23
1.9. Justificación.....	25

Capítulo II. Hipótesis y Objetivos

2.1. Hipótesis.....	26
2.2. Objetivo.....	26
2.2.1. Objetivos particulares.....	26

Capítulo III. Materiales y Métodos

3.1. Células.....	27
3.2. Anticuerpos.....	30
3.3. Ensayos de Fagocitosis.....	31
3.4. Inmunofluorescencia indirecta.....	33
3.5. Digestión del anticuerpo anti-CD13 con ficina para la obtención de fragmentos F(ab') ₂	34
3.6. Purificación de los fragmentos F(ab') ₂ por cromatografía de afinidad con proteína A.....	34
3.7. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%.....	35

Capítulo IV. Resultados

4.1. Estandarización de la fagocitosis y su evaluación mediante citometría de flujo.....	36
4.2. Efecto de la temperatura sobre la fagocitosis.....	39

4.3. Obtención de fragmentos F(ab') ₂ del anticuerpo monoclonal anti-CD13.....	40
4.4. Evaluación de la fagocitosis al bloquear CD13.....	42
4.5. Fagocitosis selectiva para CD13.....	43
4.6. Efecto de la opsonización de las bacterias en la fagocitosis selectiva.....	45
Capítulo V. Discusión.....	47
Capítulo VI. Conclusiones.....	52
Anexos	
I. Abreviaciones.....	53
II. Medios de cultivo y soluciones.....	54
2.1. Medios de cultivo.....	54
2.2. Soluciones amortiguadoras.....	54
2.3. Soluciones utilizadas para la inmunofluorescencia.....	55
2.4. Colorante para apagar la fluorescencia en el ensayo de fagocitosis.....	56
2.5. Soluciones utilizadas en la electroforesis	57
2.6. Geles de poliacrilamida al 10%.....	58
III. Análisis de varianza en bloques.....	59
Referencias.....	62

Introducción

La respuesta inmune, es un conjunto de mecanismos que tienen como función reconocer y eliminar microorganismos patógenos para mantener la homeostasis en el organismo. En esta respuesta participan barreras físicas y químicas, proteínas solubles, moléculas que median inflamación y células. Los macrófagos, son las células del sistema inmune las cuales a través de diversos receptores en su membrana celular, reconocen al microorganismo y mediante la fagocitosis, lo internalizan y procesan para posteriormente presentar pequeños péptidos del patógeno en moléculas de MHC II y de esta manera continuar con la respuesta inmune.

Existen muchas moléculas en la membrana celular de los macrófagos que les permiten reconocer a los microorganismos invasores, sin embargo no todas son responsables de que se dispare la fagocitosis, algunas de estas moléculas favorecen la adhesión entre el macrófago y la bacteria mientras otras actúan como moléculas reguladoras de señales que modulan los mecanismos efectores de estas células.

Dentro de los receptores fagocíticos existe una variedad grande, los FcRs reconocen la porción Fc de las inmunoglobulinas que opsonizan al patógeno, el receptor de manosa y el DC-SIGN reconocen azúcares en la pared celular de las bacterias, dectina-1 reconoce β -glucanos en la pared celular de hongos y los receptores de la familia *scavenger*, como el (SR A1/2) y el receptor de macrófagos con estructura de colágeno (MARCO), son capaces de reconocer el lípido A del lipopolisacárido de la pared celular de bacterias Gram negativas o ácidos lipoteicoicos en la pared celular de bacterias gram positivas.

Es claro que últimamente se han descrito nuevos receptores que reconocen estructuras conservadas en la pared celular de diversos patógenos y es gracias a esto que desempeñan un rol muy importante en la respuesta inmune innata. Sin embargo, cabe notar que la diversidad de estos receptores es muy grande y la gama de ligandos a los que se pueden unir es cada vez más extensa.

Este punto es importante en el desarrollo de este trabajo, ya que nos invitó a estudiar a CD13 como una molécula que pudiera estar involucrada en la fagocitosis de bacterias, ya que se sabía que participa en procesos de adhesión celular además de cooperar funcionalmente con Fc γ R's aumentando la fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG. Aunque no se conocen los ligandos naturales para CD13, el hecho de que medie funciones de adhesión y que pueda interactuar funcionalmente con receptores Fc γ R's, plantea la posibilidad de que CD13 pueda interactuar con

otros receptores fagocíticos facilitando la fagocitosis. Es por esto, que en éste proyecto quisimos evaluar la posibilidad de que CD13 pudiera cooperar con algún receptor que reconoce moléculas en la superficie de bacterias y que de esta manera se pudiera favorecer la fagocitosis.

Capítulo I. Marco Teórico

1.1 El sistema inmune

La función del sistema inmune en los seres vivos es la de reconocer y eliminar microorganismos patógenos (virus, bacterias, hongos, protozoarios, etc.). Al conjunto de mecanismos que participan en el reconocimiento del patógeno y que juegan algún papel en su eliminación se le llama respuesta inmune (RI).

En los vertebrados, en una RI participan dos clases de mecanismos: los innatos y los adquiridos o adaptativos. Los mecanismos innatos están presentes desde el nacimiento, no son inducibles y no tienen memoria. El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra los patógenos y actúa contra las infecciones de una manera rápida logrando eliminarla y en ocasiones impedirla. Reconoce a los patógenos a través de receptores específicos para estructuras muy conservadas de los microorganismos y sus principales son: las barreras físicas y químicas que impiden la entrada del patógeno al organismo, proteínas solubles como el complemento que favorecen la destrucción del microorganismo, moléculas que median la inflamación como las citocinas y distintos tipos de células (leucocitos) que llevan a cabo diferentes funciones. Entre estas funciones, destacan la fagocitosis de bacterias que llevan a cabo los neutrófilos y macrófagos y la liberación de histamina y prostaglandinas por células cebadas en infecciones parasitarias.

Por su parte, los mecanismos adaptativos son inducibles y se activan más tarde en respuesta a la presencia de patógenos. Las células responsables de la respuesta adaptativa son los linfocitos y es gracias a ellos que la especificidad de la respuesta es mucho mayor, ya que pueden reconocer y responder contra prácticamente cualquier antígeno con base en su amplio repertorio en cuanto a receptores de antígenos como el receptor de linfocitos T (TCR) y el receptor de linfocitos B (BCR). En la respuesta adaptativa, al igual que en la innata, participan mediadores solubles como los anticuerpos, los cuales reconocen a los antígenos específicos del patógeno y favorecen la eliminación de éste. Una característica única de la respuesta adaptativa consiste en su capacidad para generar una memoria inmunológica, tal que si un individuo entra en contacto una segunda vez con un patógeno, el organismo estará listo e instrumentará una respuesta más rápida y más fuerte para combatirlo.

Aún cuando se hable de respuesta inmune innata y adaptativa, debe subrayarse que ambas funcionan de manera conjunta y coordinada. La respuesta innata es

necesaria para estimular a la adaptativa, para regularla y para participar en mecanismos efectores. Así mismo, la actividad de los leucocitos de la inmunidad innata es regulada por moléculas producidas por la respuesta adaptativa.

1.2 El sistema fagocítico mononuclear

Como se mencionó anteriormente, dentro del sistema inmune innato las células fagocíticas llevan a cabo funciones efectoras muy importantes, entre las que destaca la fagocitosis. Sin embargo, antes de entrar a este tema es importante hablar del origen, desarrollo y destino de estas células.

Todos los elementos formes y componentes celulares de la sangre (eritrocitos, plaquetas y leucocitos) derivan de células progenitoras hematopoyéticas pluripotentes que residen en la médula ósea (figura 1). Estas células dan origen al precursor mieloide del cual se van a originar las células cebadas, los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y los monocitos (Janeway 1992).

Los monocitos que circulan en sangre dan origen a una amplia variedad de macrófagos que se distribuyen a través de todo el cuerpo, así como a células dendríticas y osteoclastos. Los precursores en médula ósea, los monocitos en circulación, los macrófagos, las células dendríticas y los osteoclastos constituyen el sistema fagocítico mononuclear. Estímulos inflamatorios, metabólicos o inmunológicos pueden promover un gran reclutamiento de monocitos en lugares de la periferia, así como la diferenciación de estos últimos a macrófagos o células dendríticas y su activación para contribuir a la defensa del hospedero y la reparación y la remodelación de tejidos (Gordon & Taylor, 2005).

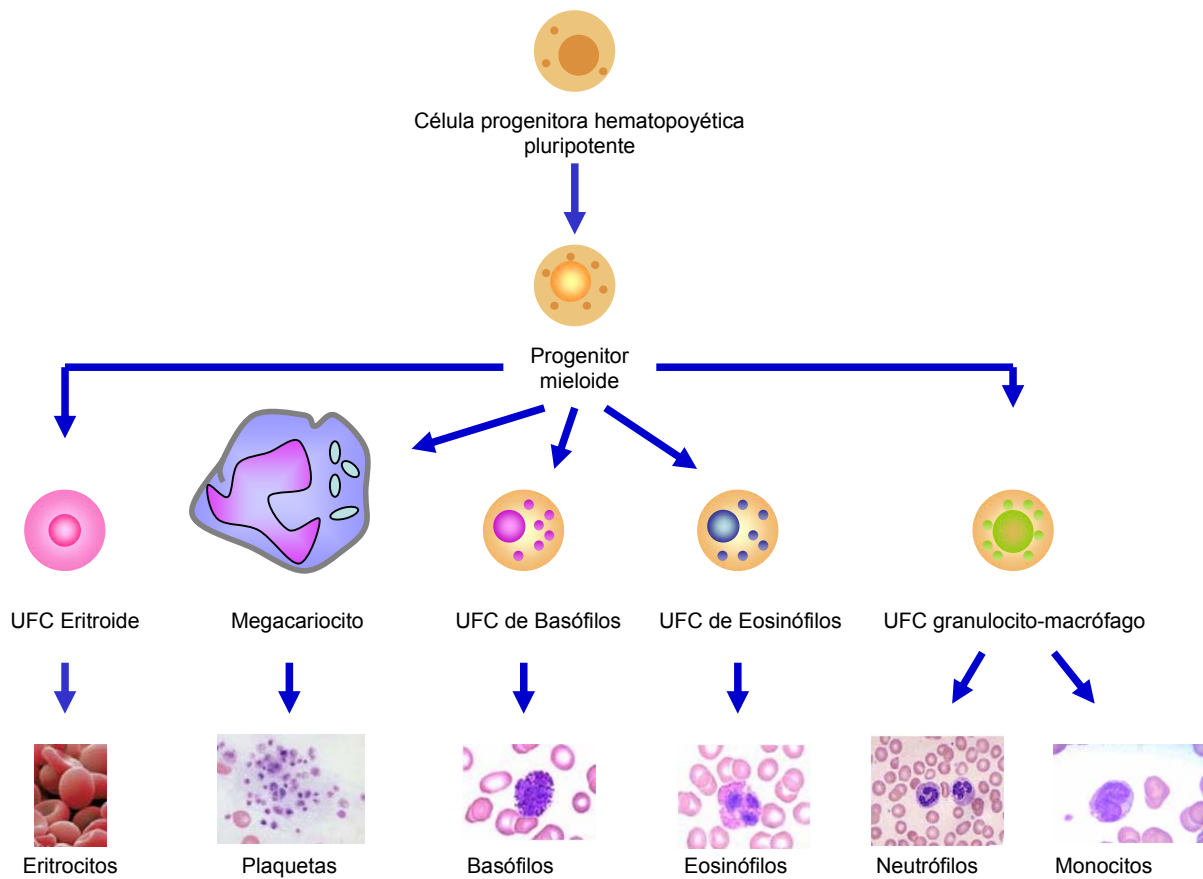


Figura 1. Hematopoyesis. Se ilustra el desarrollo de los diferentes tipos celulares que se encuentran en sangre. A partir de la célula progenitora hematopoyética pluripotente se genera un progenitor mieloide y un progenitor linfoide. El progenitor linfoide da origen a linfocitos T y B, células NK y un subtipo de células dendríticas. Para fines del trabajo sólo nos enfocamos en el desarrollo de células a partir del progenitor mieloide. UFC = Unidad Formadora de Colonia.

1.2.1 Heterogeneidad en macrófagos

Además de las células en circulación que migran a los tejidos en los que ocurre un proceso inflamatorio, existen poblaciones de macrófagos residentes en tejidos que también provienen de monocitos de circulación y que no necesitaron de un estímulo inflamatorio para salir de la circulación y colonizar un tejido. La heterogeneidad en el fenotipo de los macrófagos residentes en diferentes tejidos, refleja la especialización de las funciones que han adoptado las células dependiendo del microambiente en el que se hayan establecido. De esta manera, encontramos que los macrófagos reciben nombres diferentes y tienen características fenotípicas diferentes dependiendo del tejido en el que se encuentren. Algunos ejemplos son:

-Células de Küpffer: Se encuentran en los sinusoides del hígado, y dado que se encuentran en contacto directo con la sangre, son responsables de fagocitar partículas indeseables que se encuentren en la circulación. Estas células se originan a partir de monocitos en circulación o por proliferación local (Crofton et al, 1978).

-Macrófagos esplénicos: Existen diversos tipos de macrófagos esplénicos, que se localizan en distintas zonas del bazo. En la pulpa blanca se ubica un tipo de macrófagos que se encarga de eliminar células apoptóticas. Los macrófagos de la zona marginal se localizan adyacentes a vasos sanguíneos y expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRR's), como sería un homólogo de la molécula intracelular de adhesión específica de células dendríticas (DC-SIGN). La función de estos macrófagos consiste en reconocer y eliminar antígenos provenientes de patógenos en sangre (Geijtenbeek et al, 2002). Los macrófagos metalofílicos se encuentran adyacentes a la pulpa blanca y, aunque su función no se conoce, se cree que pueden tener importancia durante las infecciones virales (Eloranta et al, 1999).

-Macrófagos alveolares: Se encuentran en los pulmones y, gracias a su alta expresión de PRR's y receptores *scavenger* son capaces de reconocer y eliminar microorganismos, virus o partículas que ingresan por vía aérea. Se originan tanto a partir de monocitos provenientes de la sangre como por proliferación local (Gordon & Taylor, 2005).

-Osteoclastos: Son células multinucleadas encargadas de la remodelación del hueso. Su precursor es la unidad formadora de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CFU) y factores tales como el receptor activador para el ligando del factor nuclear κ B (RANKL) y el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) producidos en el microambiente de la médula parecen críticos para el desarrollo de los osteoclastos (Roodman D. 1999).

-Células de Langerhans: Son células dendríticas que colonizan la epidermis durante la ontogenia. Se pueden originar tanto por precursores de la médula ósea como por proliferación local. Se consideran células presentadoras de antígeno, ya que se encargan de detectar agentes extraños, internalizarlos, procesarlos y viajar a los nódulos linfáticos para presentarlos a linfocitos T (Gordon & Taylor, 2005).

-Macrófagos en el sistema nervioso central (SNC): Al igual que en el bazo, en el SNC existen varios tipos de macrófagos. La microglia se encuentra en el cerebro y las células que la conforman pueden originarse de monocitos circulantes que cruzan la barrera hemato-encefálica y se diferencian o pueden proliferar *in situ*. Su función es regular la remodelación del tejido, eliminar neuronas apoptóticas y presentar antígeno (Peracchia et al, 2001). También existen macrófagos perivasculares que rodean pequeños vasos sanguíneos, macrófagos de la meninges y macrófagos del plexo coroide, los cuales regulan la entrada de antígenos en la interfase entre la sangre y el líquido cefaloraquídeo (Gordon & Taylor, 2005).

1.3 Activación y Funciones Efectoras de Macrófagos

A pesar de las diferencias morfológicas y fenotípicas entre los distintos tipos de macrófagos que se encuentran distribuidos a través del organismo, todos ellos participan en toda una serie de mecanismos efectores que los convierten en piezas claves de la respuesta inmune.

En un proceso inflamatorio, la función principal de los macrófagos es la de migrar a los sitios en donde exista una infección, activarse, participar en la eliminación del patógeno de una manera mas eficiente y en la posterior reparación del tejido. La forma en la que los macrófagos se van a activar, va a depender de los estímulos a los que estén expuestos (figura 2) y, a su vez, estos estímulos van a definir el fenotipo y la actividad fisiológica que van a desarrollar.

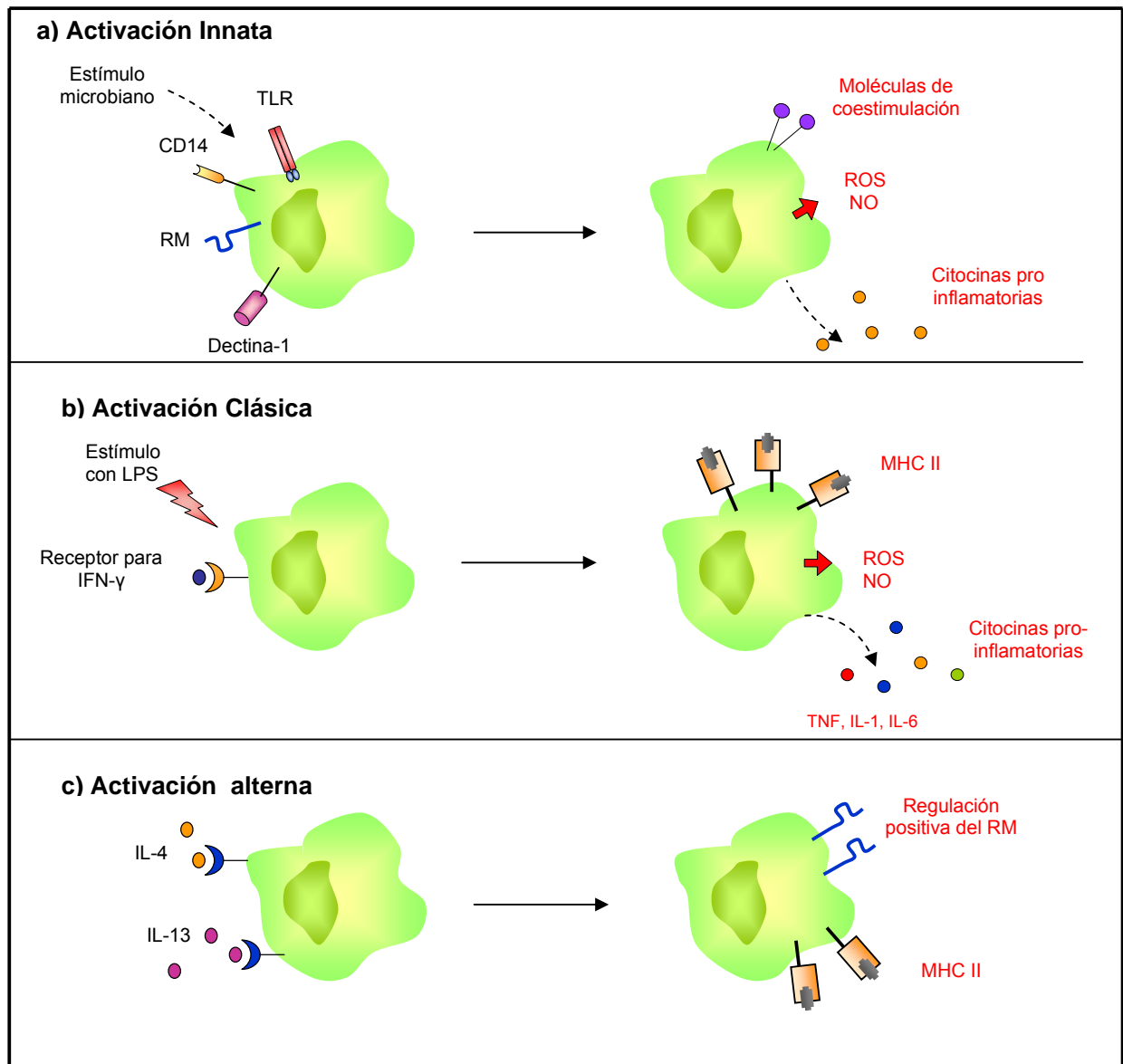


Figura 2. Activación en macrófagos. **a)** La activación innata se da cuando el macrófago reconoce antígenos bacterianos por algún PRR como los receptores tipo Toll (TLR's), el receptor de manosa (RM) o el receptor de β -glucanos (Dectina-1). Como consecuencia, aumenta la expresión de moléculas de coestimulación, hay un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y se liberan citocinas pro-inflamatorias. **b)** La activación clásica se da por IFN- γ y un estímulo bacteriano. La respuesta consiste en un aumento en la presentación de antígeno, el desencadenamiento del estallido respiratorio y la liberación de citocinas pro-inflamatorias. **c)** La activación alterna se da por IL-4 e IL-13 actuando a través del mismo receptor (IL-4R α). Hay una sobre expresión del receptor de manosa y un aumento en la expresión de moléculas de MHC II.

1.3.1 Activación Innata

Si un macrófago residente en cualquier tejido, o un monocito circulante detectan componentes bacterianos tales como lipopolisacárido (LPS), ácido lipoteicoico o peptidoglicano, ello va a representar un estímulo suficiente para activarse, y aumentar su capacidad para producir especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, incrementar la expresión de moléculas coestimuladoras y liberar citocinas pro-inflamatorias. Una vez que el macrófago haya internalizado al microorganismo, el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO) va a favorecer y a agilizar la destrucción del patógeno; además, una vez que se han generado péptidos bacterianos estos pueden ser presentados en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) a linfocitos T cooperadores (CD4+) con mayor eficiencia, gracias al aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras durante la activación del macrófago (Gordon, S. 2003). Al entrar en contacto con LPS, los macrófagos liberan citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 12 (IL-12) las cuales van a favorecer el reclutamiento de leucocitos en el sitio de inflamación y la producción de interferón gamma (IFN- γ) por linfocitos T cooperadores y células NK (Abbas & Lichtman, 2005).

1.3.2 Activación clásica

La activación clásica de los macrófagos es muy común en infecciones difíciles de combatir, ya que la respuesta microbicida que se genera es muy importante, incluido el proceso de presentación de los antígenos bacterianos. Esta activación se da en presencia de linfocitos efectoros T_H1 y compuestos bacterianos (principalmente LPS). Los linfocitos T_H1 se encargan de liberar IFN- γ , el cual representa la principal citocina que activa a macrófagos, aumentando su capacidad fagocítica y estimulando la expresión de moléculas de MHC de clase I y II, el antígeno de leucocitos humanos DM (HLA-DM) y el transportador asociado con el procesamiento de antígeno (TAP) entre otras (Abbas & Lichtman, 2005). Por otro lado, los linfocitos T_H1 expresan el ligando de CD40 (CD40L) y su unión al CD40 de los macrófagos va a activar una vía de señalización a través de la cual se expresen factores de transcripción tales como el factor nuclear kappa-B (NF- κ B) y la proteína activadora-1 (AP-1), que van a promover la producción de citocinas como el TNF, IL-1 e IL-12, la síntesis de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como un aumento en la cantidad de enzimas lisosomales.

Por último, el macrófago activado de esta manera, también va a aumentar sus niveles de expresión de moléculas coestimuladoras y del MHC (Abbas & Lichtman, 2005).

1.3.3 Activación alterna

Otro tipo de activación de macrófagos tiene lugar en presencia de las citocinas IL-4 e IL-13. Normalmente ambas citocinas se consideraban desactivantes junto con IL-10; sin embargo, ahora se sabe que IL-4 e IL-13 inducen cambios fenotípicos en los macrófagos diferentes a los promovidos por IL-10. De hecho, aumentan la expresión del receptor de manosa (RM) y de moléculas MHC II, que a su vez estimulan la endocitosis y la presentación de antígeno, respectivamente (Stein, M. et al. 1992). Por otra parte, inducen la expresión de ciertas quimiocinas y enzimas intracelulares implicadas en el reclutamiento celular y en la formación de granulomas (Hesse, M. et al. 2001). Tanto IL-4 como IL-13 son consideradas citocinas de respuestas inmunes tipo T_H2 , lo que significa que se desencadenarían tras la infección con parásitos y en distintos tipos de alergias. Normalmente estas infecciones son resueltas por las células cebadas, al liberar mediadores como histamina y prostaglandinas; sin embargo, los macrófagos también juegan un papel en este tipo de infecciones, ya que al ser activados por IL-4 e IL-13, favorecen la producción de quimiocinas como CCL22 y CCL17 que atraen linfocitos, favoreciendo la polarización de la respuesta hacia T_H2 (Imai, T. et al. 1999).

1.3.4 Actividad Microbicida de Macrófagos

Para que los macrófagos activados sean capaces de eliminar a la bacteria fagocitada, es necesario que produzcan moléculas microbicidas dentro del fagosoma que contiene a la bacteria. La fusión del fagosoma con el lisosoma resulta en la formación del fagolisosoma, en donde se llevan a cabo la mayoría de los eventos microbicidas. Uno de los eventos más importantes es el estallido respiratorio, el cual se debe a la actividad de la NADPH oxidasa que cataliza la generación de aniones superóxido dentro del fagolisosoma y a la enzima superóxido dismutasa, que los dismuta a peróxido de hidrógeno. En el caso de los neutrófilos, el peróxido de hidrógeno es un sustrato de la enzima mieloperoxidasa, la cual origina radicales hidroxilo, ácido hipocloroso y cloraminas, mismas que son muy tóxicas para las bacterias. Además, como productos secundarios del estallido respiratorio se pueden

generar otros ROS como el oxígeno singlete, que tienen actividad microbicida (Borregaard, 2005). Además de generar ROS, los macrófagos producen intermediarios reactivos de nitrógeno principalmente el radical óxido nítrico, el cual es generado por la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Esta enzima está ausente en macrófagos no activados pero puede ser inducida durante su activación, en respuesta al contacto con LPS u otros componentes bacterianos, así como en presencia de IFN- γ . La iNOS cataliza la conversión de arginina a citrulina liberando radical óxido nítrico en forma de gas, el cual difunde hacia el fagolisosoma y se combina con peróxido de hidrógeno o superóxido para formar radicales peroxinitrito, que tienen actividad microbicida (Wink D.A. et al, 2002). Por último, cabe mencionar que los macrófagos activados también producen enzimas proteolíticas que ocasionan la eliminación de los microorganismos. Un ejemplo de estas enzimas es la lisozima, la cual rompe enlaces glucosídicos entre el ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina, azúcares que constituyen el peptidoglicano de la pared celular de las bacterias Gram positivas. Al romperse la pared de las bacterias, éstas pierden su estabilidad membranal y posteriormente se lisan debido al desbalance osmótico en el que se encuentran (Brown et al, 2007). Otras enzimas localizadas dentro del lisosoma de los macrófagos son las proteasas de cisteína o aspartato mejor conocidas como catepsinas, las cuales ejercen una actividad proteolítica que resulta crucial para la degradación de péptidos en el proceso de presentación de antígeno (Honey & Rudensky, 2003).

1.4 Receptores de reconocimiento de microorganismos

Dado que una de las funciones principales del sistema inmune en los seres vivos es la de reconocer y eliminar microorganismos patógenos, es necesario que cuente con receptores específicos que le permitan detectar la presencia de ciertas estructuras conservadas en patógenos y que no son encontradas en células eucariontes. A estas estructuras moleculares se les llama PAMP's (por *pathogen-associated molecular patterns*) y sus receptores son conocidos como PRR's (por *pattern recognition receptors*) (Janeway, 1992)

Dentro de los PRR's existen receptores solubles, receptores expresados en la membrana de las distintas células y receptores citoplásmicos. Ejemplos de estos PRR's y sus ligandos se muestran en la tabla 1. De estos receptores, no todos son considerados fagocíticos. Por ejemplo, los receptores tipo-Toll (TLR's), que conforman un grupo muy importante de receptores que reconocen ciertas estructuras en patógenos, no funcionan directamente como receptores fagocíticos; su principal función es activar los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 y promover la producción de citocinas pro-inflamatorias (Myeong Sup Lee & Young-Joon Kim, 2007). Sin embargo, se ha demostrado que estos receptores pueden modular la fagocitosis regulando la formación y maduración del fagosoma y la expresión de receptores fagocíticos (Underhill & Gantner, 2004). En cambio el receptor de manosa, el receptor *scavenger A* (SRA), el receptor de macrófagos con estructura de colágeno (MARCO), los receptores del complemento CR3/CR4 y el receptor Dectina-1 pueden mediar directamente la fagocitosis.

Familia	Proteína	Ligando
TLR's	TLR1	Lipopéptidos triacílicos derivados de bacterias y micobacterias
	TLR2	Lipopéptidos y lipoarabinomananos de micobacterias, zymosan
	TLR3	dsRNA viral
	TLR4	LPS de bacterias Gram negativas, mananos de <i>C. albicans</i> , proteínas virales de la envoltura del virus respiratorio sincicial (RSV)
	TLR5	Flagelina
	TLR6	Zymosan, lipopéptidos de <i>Mycoplasma</i>
	TLR7	ssRNA viral, algunos siRNA, poli U sintético
	TLR8	ssRNA viral
	TLR9	Secuencias CpG de bacterias y virus
	TLR10	--
	TLR11	Ligandos en bacterias uropatógenicas
Lectinas tipo-C	Receptor de Manosa	Ligandos con manosa, fucosa, N-acetilglucosamina, hidrolasas lisosomales, hongos, virus
	DC-SIGN	Oligosacáridos de manosa como la proteína gp120 del VIH
	Dectina-1	β -glucanos de la pared celular de bacterias y hongos.
Receptores Scavenger	SRA	Células apoptóticas, LDL modificado
	CD36	LDL oxidado, lípidos diacílicos de bacterias, células apoptóticas
	MARCO	Bacterias Gram positivas y negativas, LDL modificado.

Tabla 1. Algunos de los receptores encontrados en macrófagos y sus ligandos. (Adaptado de: Myeong Sup Lee & Young-Joon Kim. 2007. *Signaling Pathways Downstream of Pattern-Recognition Receptors and Their Cross Talk. Annual Reviews in Biochemistry* 76:447-480)

1.5 Fagocitosis

A finales del siglo XIX, Ilya Metchnikoff, un microbiólogo ruso, describió por primera vez la fagocitosis como un proceso mediante el cual los macrófagos internalizan bacterias para su degradación (Russell D. 2001). Hoy en día se sabe que la fagocitosis corresponde a un proceso dinámico muy complejo en el cual intervienen mecanismos de transducción de señales, remodelación del citoesqueleto dependiente de actina, tráfico de membranas e internalización de partículas mayores de $0.5\mu\text{m}$ de diámetro.

La diferencia entre la fagocitosis y otros mecanismos de internalización, tales como la pinocitosis y la endocitosis mediada por receptores, radica en que en la pinocitosis se internalizan normalmente solutos y fluidos y, en la endocitosis mediada por receptores se internalizan partículas menores a $0.5\mu\text{m}$ de diámetro. A nivel bioquímico, estos dos últimos mecanismos son dependientes de clatrina e independientes de actina (Aderem & Underhill, 1999).

La fagocitosis la llevan a cabo tanto organismos unicelulares (*Entamoeba*, *Paramecium*, *Tetrahymena*, etc.) como células eucariontes (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y demás tipos celulares de linaje monocítico). De hecho, se sabe que la mayoría de las células tienen cierta capacidad fagocítica; por ejemplo, las células de tiroides y las epiteliales de vejiga son capaces de fagocitar eritrocitos *in vivo* mientras que muchas otras fagocitan partículas en cultivo (Aderem & Underhill, 1999). Sin embargo, los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas se conocen como “fagocitos profesionales”, ya que son muy eficientes internalizando partículas. Esta diferencia entre fagocitos profesionales y no profesionales radica, entre otras cosas, en la presencia de receptores fagocíticos, los cuales son muy diversos.

1.5.1 Modelos de fagocitosis

Con base en las observaciones que se han hecho sobre la internalización de partículas, se han descrito dos modelos que ayudan a comprender cuáles son los eventos que ocurren a nivel de la membrana celular tras el contacto de la célula con la partícula.

El modelo de *zipper* (figura 3) fue descrito por Griffin y colaboradores en 1975, para describir la fagocitosis de partículas opsonizadas con inmunoglobulina G (IgG), y propone que la fagocitosis se logra a través de una secuencia de interacciones ligando-receptor que guían a la membrana celular a cubrir la partícula opsonizada con IgG. De acuerdo con este modelo, el avance de la copa fagocítica (la zona de contacto célula-partícula) ocurre de manera progresiva y ordenada gracias a las interacciones locales entre los receptores que reconocen la porción Fc de la inmunoglobulina G (Fc γ R) y la IgG que opsoniza la partícula (Griffin et al 1975).

Sin embargo con este modelo se asume que se producen fagosomas con muy poco volumen luminal lo cual no es observado en todos los procesos de fagocitosis. En cambio existe otro modelo llamado *ruffling* en el cual se ha visto que la fagocitosis de bacterias como *Salmonella* y *Shigella* ocurre por un movimiento extensivo de la membrana del macrófago que inicia a una distancia considerable de donde se encuentra adherida la bacteria y que es lo suficientemente grande como para internalizarla por completo. De hecho, es lo suficientemente grande como para acarrear pequeñas partículas que se encuentren en el medio extracelular, las partículas mas grandes los eritrocitos, no son acarreadas con tanta facilidad y por lo tanto, la fagocitosis pasiva de estas partículas es rara (Swanson & Baer, 1995).

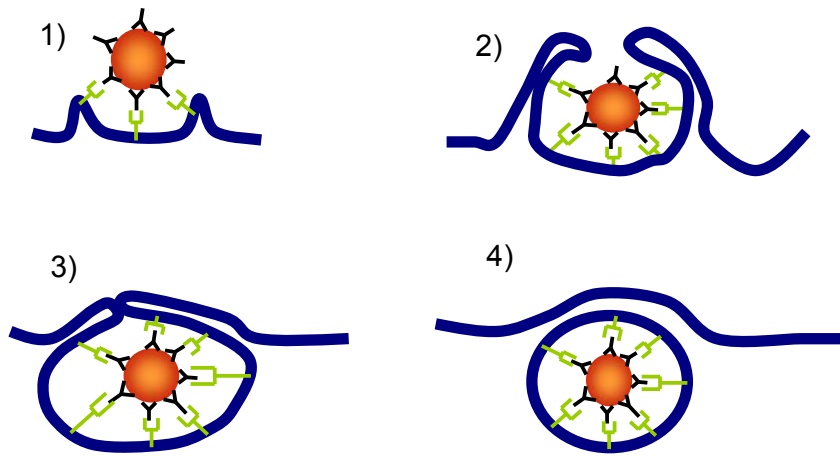


Figura 3. Modelo de zipper para la fagocitosis. En este esquema se muestra cómo la membrana del macrófago va recubriendo a la partícula opsonizada de una forma ordenada y progresiva gracias a las interacciones locales entre los Fc γ R's y las IgGs que recubren a la partícula.

1.5.2 La fagocitosis como proceso organizado

Ya sea que la fagocitosis ocurra de acuerdo al modelo de *zipper* o *ruffling*, se trata de un proceso muy complejo y específico, dependiendo del tipo y tamaño de la partícula involucrada, en donde sólo las moléculas necesarias para llevar a cabo la internalización están presentes en la copa fagocítica (las no requeridas son excluidas de esta región). Con base en estas observaciones, se ha demostrado que durante el proceso no se internaliza simplemente un segmento grande de la membrana plasmática (MP) sino que el fagosoma se forma a partir de la fusión de la MP con organelos intracitoplasmáticos tales como el retículo endoplásmico (RE), unión que continúa ocurriendo durante la formación de la copa fagocítica. Este fenómeno llamado remodelamiento de la membrana, implica también la migración de distintas proteínas hacia dentro o fuera de la copa fagocítica, lo que resulta en que se encuentren las moléculas necesarias en el sitio exacto (Gagnon et al, 2002).

Para dirigir y hacer posible la fusión de la MP con el RE, el lisosoma y otras vesículas, existen proteínas especializadas entre las que se encuentran las proteínas de la familia Rho y las Rab, las cuales forman subgrupos dentro de la superfamilia Ras de pequeñas GTPasas. Se ha descrito que Rab5, Rab6, Rab7, Rab10 y Rab11 son reclutadas en el fagosoma por PI3-K siguiendo un orden específico ya que están encargadas de dirigir la maduración del fagosoma (Vieira et al, 2003).

Otras proteínas de la superfamilia de pequeñas GTPasas tales como Rac y Cdc42, tienen funciones que incluyen: el ensamblaje de actina, la remodelación del

citoesqueleto, la motilidad celular, la formación del pseudópodo y la expresión génica (Chimini & Chavrier, 2000). Las anexinas son otras proteínas que participan en la fagocitosis, las cuales unen fosfolípidos en un proceso dependiente de calcio (Aderem & Underhill, 1999).

Una vez que el fagosoma se cierra y entra a la vía endocítica, empieza a adquirir rápidamente proteínas lisosomales tales como las catepsinas B, D y L, encargadas de degradar proteínas y otras glicoproteínas. De esta manera, a los 5-10 minutos el interior del fagosoma tiene un pH ligeramente ácido (pH = 6.2 - 6.5), pero a los 20 minutos es considerablemente ácido (pH = 5.0 - 5.2) y muestra una gran actividad hidrolítica. Esta disminución en el pH se debe a la acumulación de complejos protones-ATPasa y su aumento correlaciona con la transición del fagosoma temprano a fagosoma tardío.

Todos estos mecanismos van a permitir al macrófago inactivar al patógeno, procesar sus proteínas, generando péptidos, para presentarlos en moléculas del MHC clase II, y activar las diferentes vías que conducen a la transcripción de genes y la producción de citocinas para así contribuir con el desarrollo de la respuesta inmune.

1.6 Fagocitosis mediada por receptores para Fc

Entre los receptores fagocíticos, quizá los mejor caracterizados sean los $Fc\gamma$ que reconocen a la porción Fc de la IgG que se encuentra opsonizando al patógeno, y el estudio de la fagocitosis mediada por dichos receptores ha hecho la mayor contribución al conocimiento actual sobre el proceso de fagocitosis.

En este sentido, han descrito receptores para la porción Fc (FcR 's) de cada una de las clases de inmunoglobulina, por lo que existen $Fc\alpha R$ (IgA), $Fc\epsilon R$ (IgE), $Fc\mu R$ (IgM), $Fc\delta R$ (IgD) y $Fc\gamma R$ (IgG). Sin embargo, se sabe que en humanos sólo 3 tipos de $Fc\gamma R$'s ($Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIIa$, $Fc\gamma RIIIa$) y el $Fc\alpha R$ son capaces de promover la fagocitosis de partículas opsonizadas (Van Vugt & Van de Winkel, 2001).

Dentro de los receptores $Fc\gamma R$, algunos activan funciones efectoras en la célula mientras que otros las inhiben. Los $Fc\gamma R$ (figura 4) que median la fagocitosis son considerados receptores activadores y una característica importante que comparten consiste en la presencia de motivos ITAMs (por *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) en su región citoplasmática y/o en sus cadenas asociadas. Por el contrario, el $Fc\gamma R$ inhibitor presenta un motivo ITIM (por *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*) en su región citoplasmática.

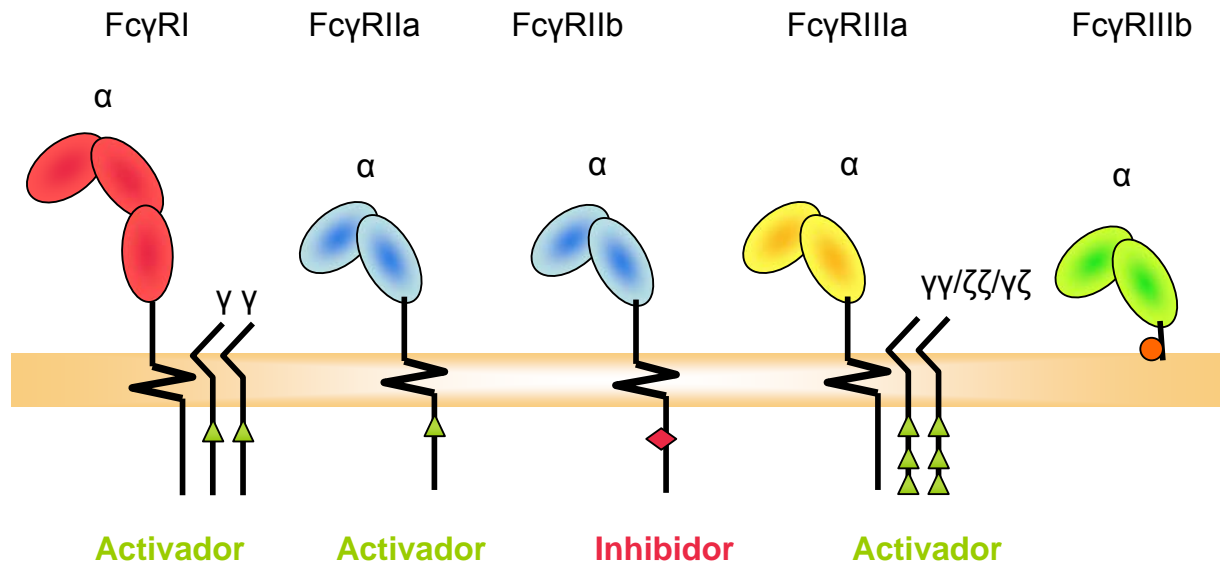


Figura 4. Estructura esquemática de los receptores FcγR's. Los receptores FcγR's se ubican en la membrana celular de la mayoría de las células del sistema inmune. Están formados por una cadena α y, en el caso de FcγRI y FcγRIIIa, por un dímero de cadenas asociadas. Los óvalos representan dominios de inmunoglobulina en la parte extracelular de la cadena α a los cuales se une la IgG. Los triángulos verdes representan a los ITAMs en los receptores activadores, mientras que los rombos rojos representan al ITIM del receptor inhibidor. En el caso del receptor FcγRIIIa éste se puede unir con homo o hetero-dímeros de cadenas γ o ζ . El FcγRIIIb se encuentra anclado a la membrana a través de un glicosilfosfatidilinositol (GPI) además de que se ha sugerido que requiere de la interacción con el receptor FcγRIIa o con el receptor para complemento CR3, para poder llevar a cabo una señalización (Vidarsson & Van de Winkel, 1998).

1.6.1 Señalización a través de Fc γ Rs activadores e inhibidores

La unión de una partícula opsonizada con IgG a una célula que exprese Fc γ R's activadores, ocasiona el entrecruzamiento de varios de estos receptores, iniciando una cascada de señalización la cual culmina con la fagocitosis de la partícula opsonizada. El primer evento bioquímico tras la agregación de los Fc γ R's, es la fosforilación de las tirosinas presentes en los ITAMs por alguna de las cinasas de la familia Src (Fgr, Hck y Lyn). Una vez fosforilados los ITAMs, estos fungen como sitios de unión de alta afinidad para proteínas que contienen dominios SH2 (*Src Homology 2 domain*) como la cinasa Syk y la subunidad p85 de PI3K. Al activarse Syk, ésta fosforila diversos sustratos; por ejemplo, Syk fosforila proteínas adaptadoras, las cuales reclutan otras moléculas del tipo GEF (*guanosine exchange factor*) que a su vez activan GTPasas de la familia Rho, como Rac y Cdc42, ambas necesarias para la polimerización de la actina y el rearrreglo del citoesqueleto (Berton et al, 2005).

Por otro lado, Syk también es necesaria para activar a la fosfolipasa C γ (PLC γ) la cual, al actuar sobre fosfatidilinositolbifosfato (PIP₂), origina la producción de inositoltrifosfato (IP3) para promover la movilización del Ca²⁺ intracelular así como también produce diacilglicerol (DAG) el cual se une a la proteína cinasa C (PKC) para activar a la fosfolipasa A2 (PLA₂), promoviendo la exocitosis focal y la extensión del pseudópodo.

Existe la posibilidad de que, tras la unión de la partícula opsonizada por IgG con los Fc γ R's, se entrecrucen no sólo los receptores activadores sino también el receptor inhibidor Fc γ RIIb así, al agregarse las cinasas de la familia Src fosforilan a los ITIMs los cuales, una vez fosforilados son capaces de unir fosfatasas de residuos de tirosina (SHP-1 y SHP-2) o fosfatasas de inositol (SHIP), que defosforilan proteínas y lípidos sí importantes mediadores de la vía de señalización de activación.

El balance entre la señalización asociada a los receptores activadores y la correspondiente a los inhibidores determina la magnitud de la respuesta celular.

1.7 Moléculas reguladoras de señales

De acuerdo con lo antes mencionado los receptores para Fc constituyen un grupo de moléculas importantes para que los leucocitos puedan desempeñar adecuadamente sus funciones efectoras. Sin embargo, algo que en muchas ocasiones se deja de lado es el hecho de que al activarse y señalizar intracelularmente, la intensidad de la señal originada también depende de la participación de moléculas coestimuladoras y co-receptoras que modulan la intensidad de la señal bioquímica y en muchos casos, determinar la naturaleza de la respuesta. Este fenómeno se ha caracterizado para el caso de los receptores de linfocitos T y B (TCR y BCR respectivamente); sin embargo, es poco lo que se sabe acerca de la modulación por otras moléculas de membrana en la activación celular mediada por FcRs.

Existe evidencia de que hay moléculas reguladoras de los FcRs, como las lectinas tipo Ig que unen ácido siálico, a las que se conoce como siglecs. Éstas son expresadas preferentemente en células hematopoyéticas, la mayoría de las cuales presentan motivos tipo ITIM en sus porciones intracitoplasmáticas, sugiriendo que podrían participar en la regulación negativa de la activación celular. Se ha demostrado que cuando siglec 3 se une al Fc γ RI, se inhiben la movilización del calcio y la fosforilación de proteínas mediada por Fc γ RI debido al reclutamiento de las fosfatasa SHP-1 y SHP-2 (Paul, S. et al, 2000). Otra evidencia de que las siglecs modulan negativamente la señalización de los FcRs, es el caso de la siglec inhibitoria mieloide de ratón (MIS) la cual, al coagregarse con Fc γ RI, provoca una disminución importante de la movilización del calcio intracelular (Braesch-Andersen, S & Stamenkovic, I ,1994).

Otro tipo de moléculas que regulan negativamente a los FcRs son los transcritos tipo Inmunoglobulina (ILTs) los cuales también presentan motivos ITIM en su porción intracitoplasmática. En macrófagos, al ligarse los ILTs con el Fc γ RIII, se inhibe la señal del calcio inducida normalmente por este receptor (Cella, M. et al, 1997).

Un ejemplo de la regulación de las señales de los FcRs vía ligandos naturales, es el caso de la proteína reguladora de señal alfa (SIRP α). Ésta se encuentra presente en macrófagos y su ligando natural es la molécula CD47, la cual se expresa en numerosos tipos celulares. El CD47 de los eritrocitos, se une a la SIRP α de macrófagos, inhibiendo la fagocitosis de los eritrocitos mediada por Fc γ Rs y el complemento, al reclutar a SHP-1 y SHP-2 (Oldenborg, P.A. et al.2001).

La inhibición de la fagocitosis por SIRP α , parece ser esencial para prevenir el desarrollo de la anemia hemolítica después de una transfusión.

Otra molécula a la que se considera reguladora de señales de los Fc γ Rs es la aminopeptidasa N (CD13). En 1989, McIntyre et al propusieron que CD13 podía cooperar con los Fc γ Rs, al observarse un aumento en el flujo de calcio cuando se incubaban monocitos con anticuerpos monoclonales anti-CD13. Se propuso que esta cooperación se podía deber a la formación de complejos de membrana entre CD13 y los Fc γ Rs al entrecruzarlos con anticuerpos monoclonales. Posteriormente, en 1996, Tokuda y Levy propusieron la posible cooperación entre CD13 y los Fc γ Rs, al encontrar que la capacidad fagocítica de las células mononucleares correlacionaba con la expresión de CD13.

En 2005, Mina-Osorio y Ortega describieron una interacción funcional entre CD13 y los Fc γ R's, al observar un aumento de la fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados con IgG, además de observar que CD13 se redistribuye a la copa fagocítica al internalizar estas partículas y que éste colocaliza con los Fc γ R's. Otras observaciones fueron que al entrecruzar CD13 y Fc γ R's obtuvieron un nivel y una duración de la fosforilación de Syk mucho mayor en comparación con la obtenida al entrecruzar solamente los Fc γ R's, lo que muestra que la coagregación de CD13 resulta en la modificación de las señales bioquímicas que se desencadenan tras la agregación de los receptores para IgG.

1.8 CD13 (aminopeptidasa N)

CD13 es una aminopeptidasa de membrana (150 kD) que depende de zinc para llevar a cabo su actividad enzimática (figura 5) y corta preferentemente extremos aminoterminales en aminoácidos neutros (Hooper, 1994). Se expresa en varios tejidos incluyendo riñón, intestino, hígado, placenta y sistema nervioso central así como en células del linaje mielomonocítico (Olsen J. et al 1997, Pirelli et al 1993). Gracias a su actividad enzimática, CD13 participa en la digestión de regiones aminoterminales de péptidos vasoactivos y quimiotácticos, citocinas, encefalinas y hormonas (Riemann et al, 1999; Ward et al, 1990; Hoffman et al, 1993; Chomarat et al, 1995; Kanayama et al, 1995).

Además, se sabe que CD13 actúa como receptor para el coronavirus humano 229E y otros coronavirus enteropatogénicos (Yeager et al, 1992) y se ha propuesto como uno de los receptores para el coronavirus responsable del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) (Yu et al, 2003). Asimismo, se ha descrito que participa en la angiogénesis, ya que se ha demostrado que los anticuerpos anti-CD13 bloquean dicho proceso *in vivo* (Hashida et al, 2002).

El entrecruzamiento de CD13 induce directamente la agregación homotípica de las células monocíticas, redistribuyéndose CD13 a las zonas de contacto célula-célula, independientemente de su actividad enzimática; por ello, se le ha propuesto como una molécula de adhesión (Mina-Osorio & Ortega, 2006). Otra evidencia de que CD13 podría actuar como molécula de adhesión, reside en que al tratar ratones con anticuerpos monoclonales de CD13 en un modelo de peritonitis, la migración transendotelial de leucocitos al peritoneo disminuye. (Salmi, M. & Jalkanen, S. 2005).

Si bien se ha encontrado que al entrecruzar CD13 con anticuerpos monoclonales se desencadena una señalización intracelular, llama la atención que CD13 tiene una porción intracelular muy pequeña, por lo que se ha sugerido que esta señalización también requiere la participación de proteínas de membrana auxiliares de origen aún desconocido (Olsen et al, 1988).

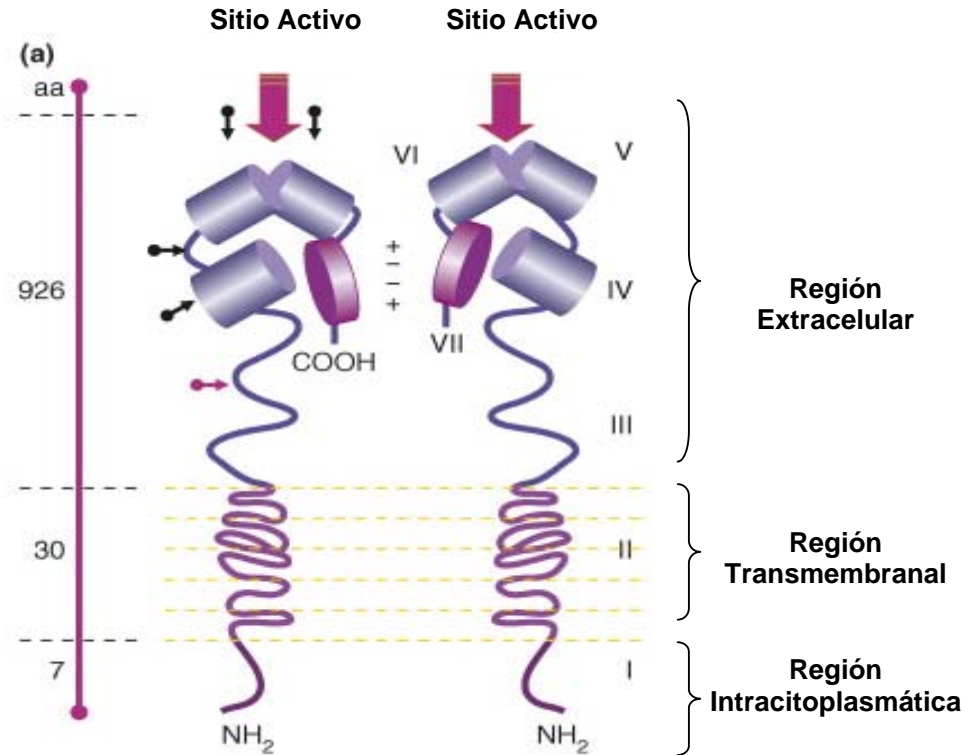


Figura 5. Estructura hipotética de la aminopeptidasa N (CD13). CD13 es una ectoenzima presente en forma de homodímeros. Como se puede observar, tiene una región intracitoplasmática muy corta. La estructura de CD13 se divide en 7 dominios indicados con números romanos del lado derecho. Los números de la izquierda representan el número de aminoácidos que conforman las regiones intracitoplasmática, transmembranal y extracelular. Las N-glicosilaciones se muestran con flechas negras en el monómero de la izquierda y las O-glicosilaciones con flechas moradas. El sitio activo de la enzima se presenta entre los dominios V y VI. (Tomado de: *Mina-Osorio P.2008. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target.*)

1.9. Justificación del problema

Se sabe que CD13 actúa como una molécula reguladora de señales para los Fc γ R's y que ésta cooperación funcional favorece la fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG. Asimismo, se sabe que CD13 tiene un dominio intracelular muy pequeño por lo que se cree que necesita de alguna otra molécula para poder señalizar. Aunque no se conocen los ligandos naturales para CD13, el hecho de que medie funciones de adhesión y que pueda interaccionar funcionalmente con receptores para Fc γ , plantea la posibilidad de que CD13 pueda interaccionar con otros receptores facilitando la fagocitosis. Es por esto, que en este proyecto quisimos evaluar la posibilidad de que CD13 pudiera cooperar con algún receptor que reconoce moléculas en la superficie de bacterias y que de esta manera se pudiera favorecer la fagocitosis.

Capítulo II. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

La aminopeptidasa (N) CD13 aumenta la fagocitosis de bacterias al cooperar con receptores específicos de éstas.

2.2 Objetivo

Determinar si CD13 participa en la fagocitosis de bacterias mediada por células monocíticas de la línea celular THP-1 así como por macrófagos derivados de monolitos de sangre periférica humana.

2.2.1 Objetivos Particulares

- a) Estandarizar un ensayo para evaluar la fagocitosis de bacterias por células monocíticas humanas mediante citometría de flujo.
- b) Evaluar el efecto que tiene el bloqueo de CD13 sobre la fagocitosis de bacterias.
- c) Estandarizar un ensayo de fagocitosis selectiva para CD13
- d) Determinar si la unión de la bacteria a la célula fagocítica a través de CD13 mejora la fagocitosis de la bacteria.

Capítulo III. Materiales y métodos

3.1. Células

THP-1

La línea THP-1 la adquirió el laboratorio de la American Type and Culture Collection (ATCC) Cat. No. TIB-202.

Descripción: Son células derivadas de una leucemia monocítica aguda, crecen en medio RPMI complementado con 10% de Suero Fetal Bovino a una temperatura de 37°C con una atmósfera de 5.0 % de CO₂. Las células se mantuvieron a una densidad de entre 4×10⁴ a 8×10⁵ células/mL.

Esta línea celular expresa receptores para complemento (CR3) y para Fc además de HLA-A2.

Macrófagos derivados de monocitos aislados de sangre periférica

- Obtención

Para aislar los monocitos, se utilizan bolsas de concentrados leucocitarios de donadores sanos donadas por el Banco de Sangre del Centro Médico Siglo XXI.

Procedimiento:

- Dividir el contenido de bolsa de buffy coat proveniente del Banco de Sangre en 2 ó 3 tubos de 50 ml de polipropileno nuevos y estériles.
- Tomar una muestra en vial de 0.65 ml nuevo y contar el número de células (Coulter) y anotar valores.
- Centrifugar todos los tubos a 550 g 30' a 20 °C, sin freno ni aceleración. Separar el suero autólogo (capa superior) con pipeta Pasteur desechable con cuidado de no tomar el anillo tratando de no llevarse interfase para no contaminar el suero con células.

-Preparación del Suero autólogo

- Inactivar el suero 30 minutos a 56° C. Centrifugar 40 minutos a 4500 RPM a 4° C. Decantar el sobrenadante en un tubo nuevo y centrifugarlo 20´ a 4500 r.p.m. a 4° C. Filtrar con filtro para jeringa (CORNING Cat. No. 101940594) de 0.22 µm.
- Agregar suero autólogo filtrado en los volúmenes que se indican: 1.5 ml de suero/ botella de 75 cm² o caja petri grande (140x20), 0.75 ml en caja petri chica (100x20) o tres gotas/pozo a placas de 24 pozos. Incubar al menos 30 minutos a 37° C en incubadora húmeda; guardar el resto de suero para complementar medio de cultivo con suero autólogo.

-Obtención de células monocíticas a partir de concentrados leucocitarios

- Después de tomar el suero autólogo, diluir 1:2 el tubo con el paquete celular con PBS 1x a temperatura ambiente.
- Preparar tubos de 50 ml con 15 ml c/u de Ficoll-Hypaque (AMERSHAM Cat. No. 17-1440-03) agregando en el centro con cuidado el Ficoll-Hypaque sin derramar sobre las paredes. Sobre la capa de Ficoll-Hypaque agregar de 25-30 ml de suspensión 1:2 de la sangre/tubo a temperatura ambiente; muy despacio por las paredes teniendo mucho cuidado de no mezclar las fases.
- Centrifugar 1000 x g a 18-20° C 30´ sin freno ni aceleración.
- Retirar con pipeta el 80% de suero y PBS. Colectar con la pipeta Pasteur los anillos de los tubos, teniendo cuidado de no tomar el Ficoll-Hypaque. Transferir el anillo a un tubo nuevo de 50 ml el cual contiene 30 ml de PBS frío en el cual se vacía el contenido del anillo (máximo dos anillos por tubo de 50 ml). Completar a 50 ml con PBS frío, lavar centrifugando a 400 g durante 10 minutos. Después de la centrifugación decantar el sobrenadante, resuspender el pellet y agregar nuevamente 50 ml de PBS frío para repetir el lavado.
- Si la muestra contiene eritrocitos, lisarlos con 2.5 ml de la solución de lisis/tubo: primero decantar perfectamente el lavado anterior, resuspender las células, agregar la solución de lisis recién mezclada y resuspender suavemente con la pipeta Pasteur, incubar por 3 minutos en hielo con agitación ocasional. Completar el volumen al cabo de la incubación a 50 ml de PBS frío; lavar centrifugando a 400 g durante 5 minutos y repetir dos lavados adicionales. En el último lavado tomar muestra para contar células.

- Contar las células y resuspenderlas en medio RPMI complementado sin suero. Ajustar la concentración de 7.5×10^6 a 10×10^6 células/ml. Repartir en cajas o botellas de cultivo para la fase de adherencia al volumen de la suspensión que se indica:

MATERIAL	CATALOGO	VOLUMEN
CAJA PETRI MEDIANA (100x20 mm)	430167-CORNING	5-7.5 ml
BOTELLA DE 75 cm ²	430725-CORNING	7.5-10 ml
CAJA PETRI GRANDE (140x20 mm)	168381-NUNC	12-25 ml

-Adherencia de los monocitos

- Incubar las cajas de 30' a 1 hr. a 37° C. Al cabo de este tiempo, lavar 5 veces con 5-10 ml de PBS a temperatura ambiente; se agrega el PBS por las paredes con mucho cuidado, resuspendiendo las células con movimientos muy suaves de la caja y no agregando el PBS directamente sobre las células. Decantar o recolectar el PBS inclinando la caja. Observar al microscopio para ver si son suficientes lavados.
- Agregar el mismo volumen de medio RPMI (indicado anteriormente) complementado con 5-10% de suero autólogo.

-Evaluación de la pureza de monocitos

- Analizar la pureza por citometría de flujo utilizando como marcador CD14, (CD14-FITC-PN IM0645U Beckman coulter o CD14-APC 555399 BD). Brevemente, incubar 400,000 células con 20 µl/tubo del anticuerpo marcado en 300 µl de buffer de lavados incubando 30' a 4° C, lavar 2 veces con buffer de lavados y 1x con PBS (5' a 1500 RPM), fijar células con 400 µl PFA al 1% en PBS lavar con PBS y resuspender en 200 µl de PBS.

-Obtención de Macrófagos

Para obtener macrófagos derivados de monocitos, los monocitos obtenidos en el protocolo anterior se deben dejar incubando durante 10 días a 37°C en medio RPMI complementado con suero autólogo.

Para despegar los macrófagos:

- Retirar el sobrenadante y agregar PBS frío. Dejar incubar 5' en hielo
- Despegar las células con ayuda de un gendarme (cell scraper, falcon cat. 353085) con cuidado y de forma ordenada, resuspender con la pipeta y colectar en un tubo para centrifugar a 1500 RPM por 5'.

3.2 Anticuerpos

- Se utilizó el anticuerpo monoclonal murino anti-CD13 humano (clona 452) de isotipo IgG1, que fue purificado a partir del sobrenadante del hibridoma donado al laboratorio por el Dr. Meenhard Herlyn del Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, PA.
- La producción de fragmentos $F(ab)'_2$ del anticuerpo anti-CD13 mediante digestión con Ficina immobilizada en agarosa (PIERCE, Rockford) se realizó según las instrucciones del fabricante.
- El anticuerpo monoclonal murino anti-Fc γ R1 (clona 32.2) fue purificado a partir del sobrenadante del hibridoma correspondiente obtenido de la ATCC.
- Los anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con FITC, la estreptavidina y los fragmentos $F(ab)'_2$ biotinilados del anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón fueron obtenidos de Zymed, San Francisco.
- La Sulfo-NHS-Biotina fue obtenida de PIERCE.

3.3. Ensayos de Fagocitosis

Fagocitosis Simple

En los ensayos de fagocitosis se utilizan tanto macrófagos como células THP-1 y en ambos casos, éstas se tiñen con el colorante Vybrant Dil (Molecular Probes) el cual fue donado por la Dra. Leonor Huerta, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, como se describe a continuación:

- Para teñir las células es necesario tener, no menos de 5×10^6 células ni más de 12×10^6 en total. Esto para asegurarnos de que todas las células se tiñan adecuadamente.
- Centrifugar las células y resuspenderlas en 1 mL de RPMI complementado con 10% de SFB.
- Preparar 10 μ L de una dilución 1:10 del colorante Dil, utilizando DMSO estéril como disolvente y agregar todo el volumen a la suspensión de células.
- Incubar las células en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente, cubiertas de la luz.
- Para lavar las células, agregar 10 mL de medio a 37°C, mezclar y centrifugar durante 3 minutos a 1000 r.p.m. (repetirlo 3 veces).
- Transferir a tubos para FACS, 8×10^5 células en caso de ser THP-1 y 1×10^6 células en caso de ser macrófagos.
- Centrifugar las células 3 minutos a 1000 r.p.m. y desechar el sobrenadante.
- Agregar 150 μ L de la suspensión de bacterias (Fluorescein-labeled *Escherichia coli* K-12 BioParticles, Molecular Probes) a cada tubo.
- Incubar en baño maría con agitación a 37°C en oscuridad durante 1 hora 30 minutos en el caso de las THP-1 y 1 hora en el caso de los macrófagos. Como control negativo vamos a tener un tubo que se incuba el mismo tiempo a 4°C en oscuridad.
- Lavar las células con PBS frío centrifugando 3 minutos a 1000 r.p.m. (repetirlo 3 veces).
- Finalmente fijar las células incubándolas con 200 μ L de PFA 1% a 4°C en oscuridad por 20 minutos.
- Lavar las células con PBS frío centrifugando 3 minutos a 1000 r.p.m. (repetirlo 3 veces) y se resuspenderlas en 200 μ L de PBS.

Nota: Los tubos se tienen que leer en el fluorocitómetro el mismo día y deben estar protegidos de la luz hasta que esto ocurra.

Es necesario preparar otras muestras que serán utilizadas para calibrar el fluorocitómetro al momento de la lectura.

- Células solas: Necesitamos una muestra de células que no estén teñidas con Dil y que no hayan estado en contacto con bacteria.
- Células con marca verde: Para esto se realiza una inmunofluorescencia indirecta como se describe mas adelante, utilizando como primer anticuerpo F(ab)₂ anti-CD13.
- Células con marca roja: Necesitamos una muestra de células marcadas con Dil que no hayan estado en contacto con bacterias.
- Células dobles positivas: Estas son células que presentan tanto marca verde como roja, por lo que son células marcadas con Dil a las cuales se les realiza también la inmunofluorescencia indirecta.

Fagocitosis Selectiva para CD13

-Opsonización de las bacterias

- Transferir a microtubos de 1.5 mL, 300 µL de la suspensión de bacterias (Fluorescein-labeled *Escherichia coli* K-12 BioParticles, Molecular Probes).
- Lavar 2 veces con 500 µL de buffer de carbonatos 0.1 M pH = 9.5, centrifugando a 7000 r.p.m. por 2 minutos y descartando el sobrenadante.
- Agregar 1 mL de una solución de Sulfo-NHS-Biotina 1µg/mL, resuspender el pellet e incubar durante 20 minutos a 4°C en oscuridad.
- Lavar 2 veces con 500 µL de buffer de carbonatos 0.1 M pH = 9.5, centrifugando a 7000 r.p.m. por 2 minutos y descartando el sobrenadante.
- Agregar 150 µL de estreptavidina 0.025 µg/mL, resuspender el pellet e incubar 20 minutos a 4°C en oscuridad.
- Lavar 2 veces con 500 µL de buffer de carbonatos 0.1 M pH = 9.5, centrifugando a 7000 r.p.m. por 2 minutos y descartando el sobrenadante.
- Agregar 10 µL del F(ab)₂ biotinilado del anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón y aforar a 200 µL con PBS. Incubar 30 minutos a 4°C en oscuridad.
- Lavar 2 veces con 500 µL de PBS, centrifugando a 7000 r.p.m. por 2 minutos y descartando el sobrenadante.
- Resuspender el pellet de bacteria opsonizada en 150 µL de PBS.

-Tratamiento de las Células

- Transferir a tubos para FACS, 8×10^5 células THP-1 en 500 μL de medio o 1×10^6 células en caso de ser macrófagos.
- Agregar 10 μg del anticuerpo correspondiente. Incubar 1 hora a 4°C en oscuridad.
- Lavar las células con PBS frío centrifugando 3 minutos a 1000 r.p.m. (repetirlo 3 veces) descartando el sobrenadante.
- Agregar la suspensión de bacterias previamente opsonizadas e incubar en baño maría con agitación a 37°C en oscuridad durante 1 hora 30 minutos en el caso de las THP-1 y 1 hora en el caso de los macrófagos. Como control negativo vamos a tener un tubo que se incuba el mismo tiempo a 4°C en oscuridad.

A partir de este paso, la metodología es la misma que para la fagocitosis simple.

3.4. Inmunofluorescencia Indirecta

- Recolectar las células, contarlas, centrifugarlas y lavar con buffer de lavados.
- Resuspender en buffer de lavados a una concentración de 400,000 células en 300 μl /tubo.
- Colocar esta suspensión en tubos nuevos para FACS (Falcon cat. 352054).
- Dejar las células en el tubo al menos 5 minutos en hielo.
- Agregar 10 μg /tubo del 1er anticuerpo e incubar en hielo 1 hr con agitación ocasional.
- Lavar 3 veces con buffer de lavados centrifugando a 1000 r.p.m. por 3 minutos, decantar el sobrenadante, resuspender el pellet y agregar 300 μl del buffer de lavados, repetir la operación.
- Agregar 2do anticuerpo goat anti-mouse FITC (Zymed) 1:400 en buffer de lavados (300 μl /tubo).
- Incubar 30 minutos en hielo protegido de la luz con agitación ocasional.
- Lavar una vez con 300 μl de buffer de lavados y una vez con PBS frío.
- Resuspender en 400 μl de PFA 1% frío (fresco o almacenado a 4°C protegido de la luz).

- Incubar 20 minutos en hielo cubierto de la luz
- Lavar una vez con PBS frío y resuspender en 200 μ l de PBS
- Guardar protegido de la luz.

3.5. Digestión del anticuerpo anti-CD13 con Ficina para la obtención de fragmentos F(ab)₂

- De acuerdo a las instrucciones del fabricante, calcular y pesar la cantidad necesaria de ficina que hay que utilizar para llevar a cabo el experimento.
- Hidratarla en 5 mL de Tris 50 mM-EDTA 2mM pH = 7.1 durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar la ficina 4 minutos a 1000 G.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en el volumen en que se tenga el anticuerpo a digerir.
- Añadir 263 μ L de cisterna 11.38 mM en Tris 50 mM-EDTA 2mM pH = 7.1 (la concentración final de la cisterna debe ser = 1mM).
- Incubar 6 horas a 37°C en baño maría con agitación.
- Centrifugar 4 minutos a 1000 G y tomar el sobrenadante.
- Cuantificar la D.O.

3.6. Purificación de los fragmentos F(ab)₂ por cromatografía de afinidad con Proteína A.

- Previo al experimento, lavar la columna conteniendo las perlas con 5 mL de Tris 10mM-NaCl 150 mM pH = 7.8, posteriormente con 5 mL de Glicina 0.2 M pH = 2.8 y finalmente con otros 5 mL de Tris 50 mM-EDTA 2mM pH = 7.1 (Todos los lavados se desechan).
- Añadir el anti-CD13 digerido de 500 μ L en 500 μ L e ir recolectando fracciones de 500 μ L en viales de 1000 μ L .
- Añadir 1-2 mL de Tris 10mM-NaCl 150 mM pH = 7.8 para terminar de eluir el F(ab)₂.
- Determinar la densidad óptica de las fracciones leyendo en un espectrofotómetro a una λ = 280 nm y utilizando como blanco Tris 10mM-NaCl 150 mM pH = 7.8.
- Si en la última fracción la D.O. es prácticamente 0, procedemos a eluir el Fc.

- Para eluir el Fc, añadimos Glicina 0.2 M pH = 2.8 en porciones de 500 μ L y recolectar fracciones de igual volumen.
- Seguir eluyendo hasta que la D.O. sea prácticamente 0.
- Los fragmentos F(ab)₂' son las fracciones que se obtienen al añadir el anti-CD13 y eluir con Tris 10mM-NaCl 150 mM pH = 7.8 y que tengan una D.O. mayor a 0.5.
- Determinar la concentración a partir de la D.O. de la mezcla de las fracciones que corresponden a los F(ab)₂' (1.4 D.O. = 1.0 mg/ml).

3.7. Electroforésis en Gel de Poliacrilamida al 10%

Para evaluar la pureza de los fragmentos F(ab)₂' , previamente digeridos se realiza una electroforésis en gel de poliacrilamida al 10%.

- Las muestras (anticuerpo completo, anticuerpo digerido, F(ab)₂' , Fc) se analizan tanto en condiciones reductoras como no reductoras.
- Transferir lo equivalente a 15 μ g de la muestra a un vial y añadir el sample buffer para cada condición. Hervirlas durante 5 minutos.
- Cargar las muestras en el gel y correrlo a 120V durante 50 minutos - 1 hora. Tras este tiempo aumentar la corriente a 150V y dejar correr las muestras hasta el final del gel.
- Teñir con la solución para teñir geles 30 minutos en agitación moderada.
- Descartar la solución para teñir geles y enjuagar el gel con agua destilada hasta que no salga mas colorante azul.
- Agregar solución para desteñir geles hasta cubrir el gel y dejarlo reposando toda la noche.

Capítulo IV. Resultados

4.1 Estandarización de la fagocitosis y su evaluación mediante citometría de flujo.

La fagocitosis es un proceso que se ha estudiado desde hace muchos años y por lo general se usa el índice fagocítico como parámetro para comparar cuantitativamente la fagocitosis entre poblaciones celulares o entre diferentes tratamientos a los que se someten las células. El índice fagocítico se obtiene al contar al microscopio el número de partículas fagocitadas por cada cien células. Este método es relativamente sencillo y permite cuantificar fácilmente el índice fagocítico siempre y cuando las partículas fagocitadas sean grandes como es el caso de eritrocitos de carnero o zymosan. Sin embargo en el caso de la fagocitosis de bacterias, dado que éstas son muy pequeñas, es difícil determinar el número de bacterias fagocitadas por célula además de que no se distingue adecuadamente cuáles de ellas están adheridas y cuales han sido ingeridas. Por estas razones, buscamos estandarizar un ensayo mediante citometría de flujo, en el cual pudiéramos evaluar la fagocitosis discriminando entre las bacterias que están solamente adheridas a la superficie de la célula y las que realmente fueron fagocitadas.

Para llevar a cabo el ensayo se utilizaron tanto células THP-1 como macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana que se incubaron a 4°C y 37°C por diferentes períodos de tiempo con bacterias previamente marcadas con el fluorocromo FITC. (a 4°C no ocurre la fagocitosis por lo que la fluorescencia asociada a estas muestras será de las bacterias adheridas). Para apagar la fluorescencia de las bacterias que se encontraban adheridas a la membrana celular, antes de leer la muestra se agregó una solución de apagado de azul tripano (AT)(0.5 mg/mL, pH = 4.5).

En la figura 6, se observan los histogramas obtenidos por citometría de flujo en donde las curvas representan la distribución de la intensidad de fluorescencia que presentaron 10, 000 células al pasar por el detector antes y después de agregarles el AT.

Al analizar la muestra que permaneció 20 minutos a 4°C, podemos observar que las células presentan fluorescencia al leerlas inicialmente pero que esta fluorescencia se ve apagada al agregar AT. Dado que el 100% de las células caen en la región M1 de la gráfica después de agregar el AT, podemos asegurar que la fluorescencia observada al inicio, se debía a las bacterias que se encontraban adheridas a la superficie de las células y que no hubo ingestión.

Al contrario, en la muestra que permaneció 20 minutos a 37°C aún después de agregar el AT se sigue observando fluorescencia, lo que indica que las bacterias fueron fagocitadas. Esto era esperado ya que la fagocitosis es un proceso dependiente de energía por lo que en el caso de mantener las células a 4°C, se está inhibiendo el metabolismo celular y por consiguiente la fagocitosis.

Al dejar en contacto las células con las bacterias por 40, 60, 90 y 120 minutos, permitimos que las células pudieran fagocitar más bacterias y la intensidad de la señal que no es apagada por AT fuera mayor. A partir de los 60 minutos, la intensidad de fluorescencia no aumentó significativamente por lo que se determinó que para ensayos posteriores los macrófagos se incubarán 1 hora mientras que las células THP-1 se incubarán 1.5 horas, ya que se sabe que su capacidad fagocítica es menor que la de los macrófagos.

Una vez que obtuvimos los histogramas fue necesario procesar los datos para obtener el índice fagocítico y de esta manera poder graficar y comparar las muestras con diferentes tratamientos además de realizar el análisis estadístico. Como ya se dijo anteriormente, en el caso de fagocitosis de bacterias es imposible determinar por microscopía el número de bacterias fagocitadas por cada 100 células, por lo tanto, decidimos cuantificar el índice fagocítico como el producto del porcentaje de células positivas para la fluorescencia de FITC (M2) después de agregar el azul tripano por la intensidad media de fluorescencia de esa misma región.

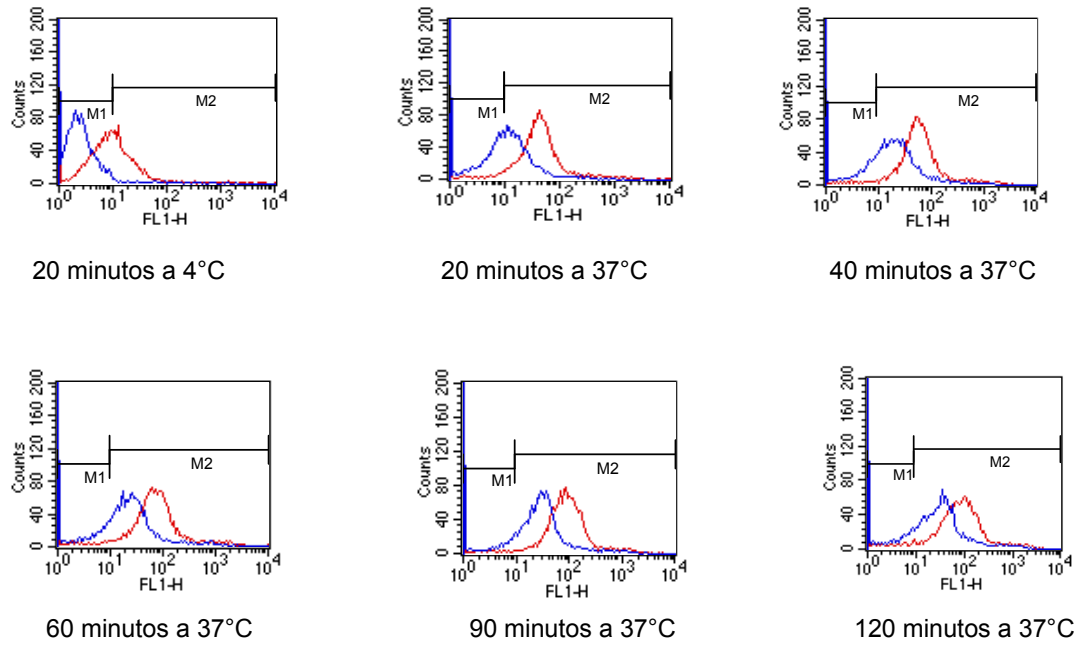


Figura 6. Histogramas para la determinación de la fagocitosis, obtenidos mediante citometría de flujo. Las curvas rojas representan las muestras al leerlas por primera vez, aquí se observa la fluorescencia de las bacterias que están tanto adheridas como fagocitadas. Las curvas azules representan las muestras al leerlas una vez que se les agrega azul tripano (0.5 mg/mL a pH = 4.5), en este caso se observa únicamente la fluorescencia de las bacterias que han sido fagocitadas. La región M1 representa la población de células negativas para la fluorescencia de FITC, la cual se ajusta con el 90% de una muestra de células sin tratamiento.

4.2 Efecto de la temperatura sobre la fagocitosis

Ya se había observado en la estandarización de la fagocitosis que a 4°C las células no fagocitaban, sin embargo fue necesario repetir varios ensayos para poder asegurar que había diferencias estadísticamente significativas entre los índices fagocíticos de las células incubadas a 4°C y las incubadas a 37°C.

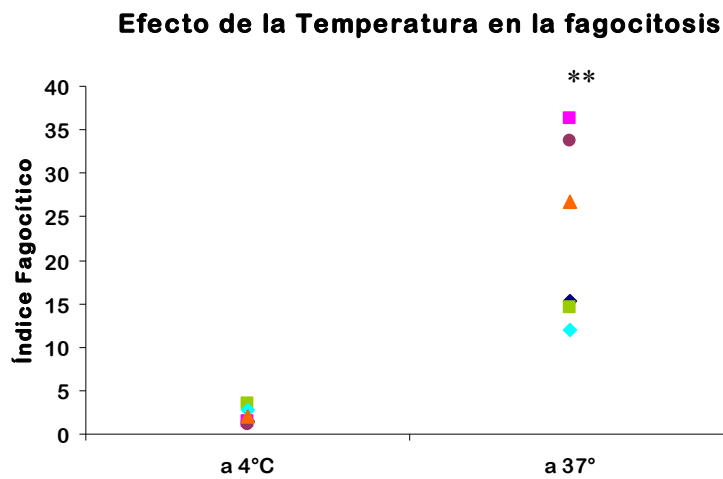


Figura 7. Efecto de la temperatura sobre la fagocitosis. En esta gráfica se muestran los índices de fagocitosis obtenidos de 6 experimentos independientes en donde las células THP-1 se incubaron durante 1.5 horas a 4°C y 37°C . Los asteriscos indican una diferencia significativa entre el índice fagocítico de las células incubadas a 37°C con respecto al índice fagocítico de las células incubadas a 4°C, determinada con una prueba de t de student pareada con $p \leq 0.05$.

4.3. Obtención de Fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos monoclonales anti-CD13

Para determinar el papel de CD13 en la fagocitosis de bacterias por macrófagos humanos, realizamos experimentos en los cuales se utilizaron fragmentos F(ab')₂ del anticuerpo monoclonal anti-CD13. Este es un anticuerpo monoclonal murino anti-CD13 humano (clona 452) de isotipo IgG1, que fue purificado a partir del sobrenadante del hibridoma donado al laboratorio por el Dr. Meenhard Herlyn del Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia.

La finalidad de usar fragmentos F(ab')₂ es asegurarnos que al incubar nuestras células con este anticuerpo, todas las moléculas van a estar uniéndose a CD13 exclusivamente y de esta manera vamos a evitar el pegado a los FcγRs a través de la región Fc en caso de utilizar el anticuerpo completo. Para obtener los fragmentos F(ab')₂, el anticuerpo se digirió con ficina y se purificó en una columna de proteína A según las especificaciones de los fabricantes como se menciona en materiales y métodos. Una vez que se obtuvieron los fragmentos se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida tanto en condiciones reductoras como no reductoras para evaluar la pureza de los fragmentos. En la figura 8, se muestra una imagen del gel. En el carril 1 se observa una banda alrededor de los 160 kDa correspondiente al anticuerpo completo sin digerir. En los carriles 2 y 3, se observa una banda con un peso de aproximadamente 110 kDa en donde se tienen los fragmentos F(ab')₂ en condiciones no reductoras y una banda más difuminada alrededor de los 50 kDa en donde se tiene el Fc. En el carril 5 tenemos el anticuerpo completo en condiciones reductoras por lo que se ve una banda ancha alrededor de los 50 kDa en donde tenemos las cadenas pesadas del anticuerpo y otra más delgada que tiene un peso de 25 kDa en donde tenemos las cadenas ligeras del anticuerpo. En el carril 6 se pasó una muestra del anticuerpo digerido antes de llevarse a cabo la purificación bajo condiciones reductoras, y en él observamos 2 bandas; una alrededor de 25 kDa y otra un poco más arriba que se encuentra aproximadamente en 30 kDa. La banda que se encuentra alrededor de 25 kDa, corresponde a las cadenas ligeras de los fragmentos F(ab')₂ y a las cadenas pesadas de la región Fc. Por otra parte, la banda que se observa en 30 kDa corresponde a las cadenas pesadas de los F(ab')₂ que acarrean un fragmento de la región de la bisagra lo cual les confiere un peso molecular mayor que a las cadenas ligeras. En ese mismo carril se observa una banda que tiene un peso de 15 kDa y que se piensa que es alguna impureza de la muestra, sin embargo no es de importancia ya que después de la purificación no vuelve a aparecer. En el carril 7, se pasó una

muestra de los fragmentos $F(ab')_2$ ya purificados y comprobamos que no hay impurezas dentro de la muestra observando solo las 2 bandas de 25 y 30 kDa aproximadamente. En el carril 8 se pasó una muestra de los fragmentos Fc que se eluyeron al final de la purificación, y con ella pudimos comprobar que no nos quedamos con anticuerpo completo y que efectivamente todo fue digerido. Por último, en el carril 9, se cargaron los marcadores de peso molecular.

Con base en estos resultados, comprobamos que las muestras correspondientes a los fragmentos $F(ab')_2$ purificados (carriles 3 y 7) no contienen anticuerpo completo ni cadenas pesadas sin digerir por lo que podemos eliminar la posibilidad de unión a los Fc γ Rs.

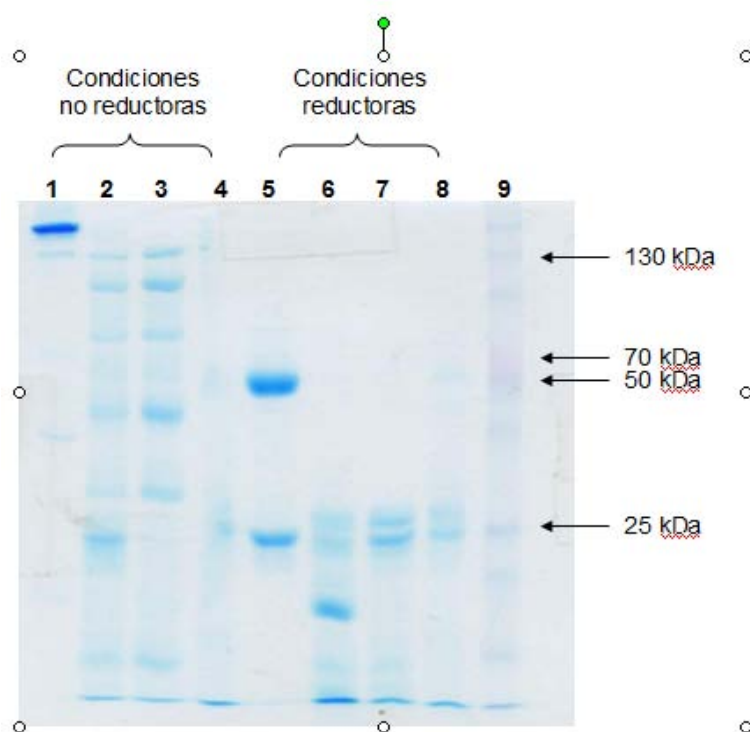


Figura 8. Evaluación de la pureza de los fragmentos $F(ab')_2$ del anticuerpo anti-CD13. Los fragmentos obtenidos de la digestión y purificación del anticuerpo, se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10% para evaluar su pureza. En el carril 1 y 5 se cargaron muestras del anticuerpo completo, en el 2 y 6 se cargaron muestras del anticuerpo digerido antes de ser purificado, en el 3 y 7 se cargaron los fragmentos $F(ab')_2$ ya purificados y en los carriles 4 y 8 se cargaron las fracciones Fc. Del carril 1 al 4 las muestras se incubaron con *sample buffer* no reductor y del carril 5 al 8 se incubaron con *sample buffer* reductor.

4.4 Evaluación de la fagocitosis al bloquear CD13

Para determinar la participación de CD13 en la fagocitosis de bacterias, se realizaron experimentos en donde CD13 fue bloqueado con anticuerpos monoclonales anti-CD13 esperando observar una disminución en la fagocitosis en el caso de que esta molécula estuviera participando. Como controles en el experimento se tuvieron muestras que se mantuvieron durante toda la incubación a 4°C para evaluar que el sistema fuera consistente y que en ese caso no se observara fagocitosis alguna. También se tuvieron muestras sin anticuerpo con las que se obtuvo una fagocitosis “basal” y con la cual se comparó la fagocitosis obtenida al tratar las células con el anticuerpo anti-CD13.

Como se observa en la figura 9, no se encontraron diferencias significativas entre las células incubadas con y sin anticuerpo.

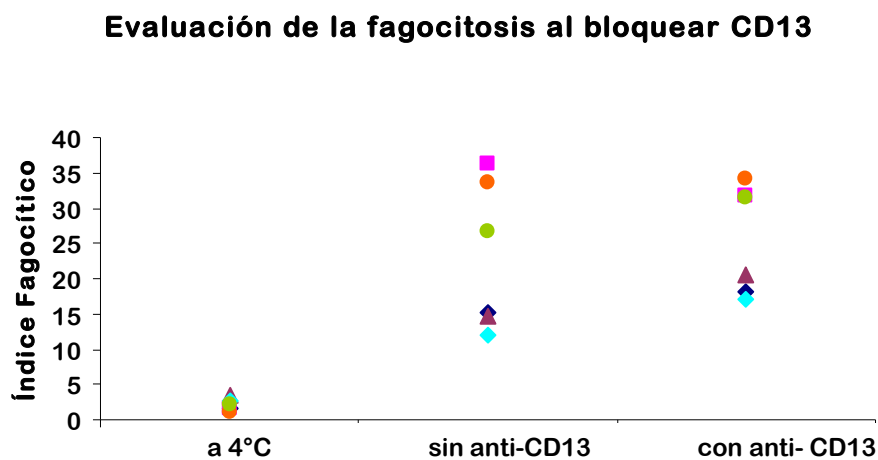


Figura 9. Evaluación de la fagocitosis bloqueando CD13. Al incubar las células con anticuerpo anti-CD13, se esperaba bloquear el reconocimiento a través de esta molécula y observar una disminución de la fagocitosis en caso de estar participando. Se analizaron los datos con una prueba de ANOVA en bloques con una confianza del 95% y se demostró que no hay diferencias significativas entre las células incubadas con y sin anti-CD13.

4.5 Fagocitosis Selectiva para CD13

Dado que no pudimos corroborar la participación de CD13 en la fagocitosis de bacterias al bloquear la molécula con un anticuerpo monoclonal, se trató de evaluar su participación en la fagocitosis con un sistema que fuera selectivo para CD13. Esto es, se buscó propiciar que las bacterias se unieran a la célula a través de CD13 además de las interacciones naturales. Con este modelo procedimos a comparar la capacidad fagocítica (expresada como índice fagocítico) de las células que interactúan con las bacterias solas o las bacterias modificadas en donde el reconocimiento se da, además de los ligandos naturales, por CD13 o por Fc γ RI en el caso de los controles. Para esto, tal como se describe en la sección de metodología, se utilizaron bacterias *Escherichia coli* K-12 BioParticles previamente marcadas con FITC las cuales fueron biotiniladas, luego se cubrieron con estreptavidina y finalmente opsonizadas con fragmentos biotinilados de un anticuerpo anti-IgG de ratón. Por su parte, las células fueron preincubadas con fragmentos F(ab')₂ de anticuerpo anti-CD13 o anti-Fc γ RI originados en ratón, por lo que de esta manera esperábamos que las bacterias opsonizadas con anti-IgG de ratón fueran fagocitadas con mas eficiencia a través de estas moléculas.

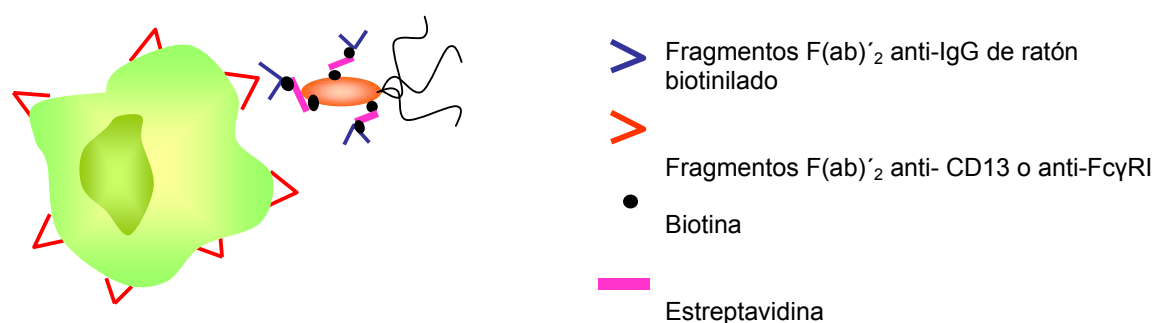


Figura 10. Modelo de fagocitosis selectiva para CD13. Para que la interacción entre bacteria y célula incluya a CD13, las bacterias se cubren con biotina, posteriormente se cubren con estreptavidina y finalmente se incuban con fragmentos de un anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón biotinilado, los cuales van a reconocer los fragmentos del anticuerpo anti-CD13 que recubren al monocito.

Para determinar la concentración de biotina a utilizar se realizó un ensayo indirecto en donde la bacteria se cubrió con biotina y posteriormente con estreptavidina marcada con HPRO (peroxidasa de rábano) en presencia de 3,3-diaminobenzidina y H₂O₂. En esta reacción de oxidación, la 3,3-diaminobenzidina se transforma en un compuesto colorido indicando la presencia de la estreptavidina-HPRO y por consiguiente de biotina.

Se probaron 6 concentraciones diferentes; 150, 100, 50, 10, 5 y 1 µg/mL. En los 6 casos, se obtuvo coloración amarilla por lo que se decidió trabajar con la concentración mas baja (1 µg/mL) para de esta manera no “saturar” la superficie de la bacteria.

Al comparar la fagocitosis selectiva para CD13 y para FcγRI con la fagocitosis de bacterias sin opsonizar, lo que ocurrió fue contrario a lo que se esperaba, ya que en la fagocitosis selectiva la capacidad fagocítica de las células disminuyó más de la mitad que en los casos de fagocitosis basal (Figura 11). Aún en el caso en que la fagocitosis se dio a través del FcγRI, que como sabemos es uno de los receptores a través de los cuales se lleva a cabo más eficientemente el proceso de fagocitosis, los índices fagocíticos obtenidos estuvieron muy por debajo de lo esperado.

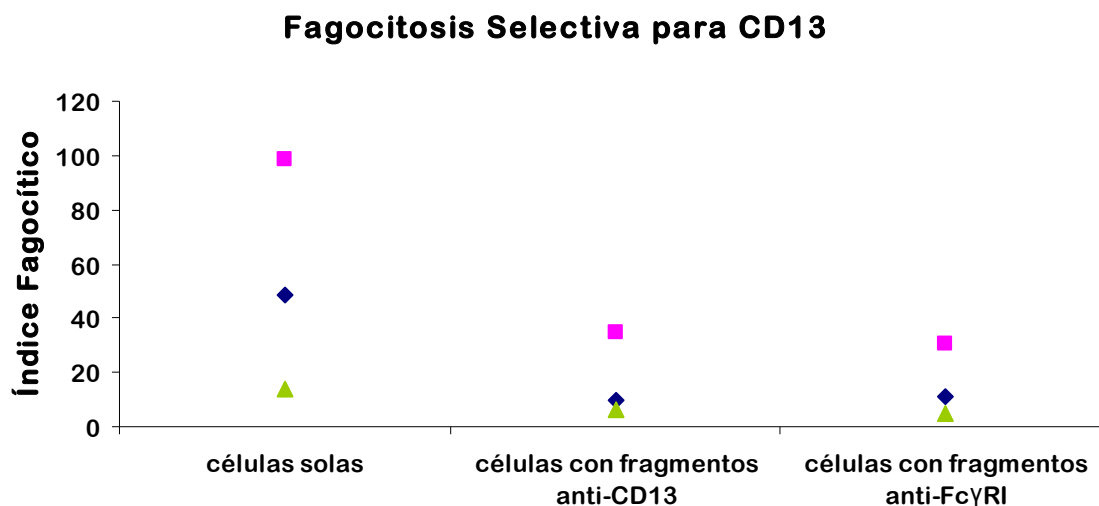


Figura 11. Fagocitosis Selectiva para CD13. En esta gráfica se muestran los índices fagocíticos, obtenidos al llevar a cabo la fagocitosis selectiva para CD13. En el caso de las células solas, las bacterias utilizadas no fueron opsonizadas por lo que la fagocitosis observada es la que consideramos “basal” a lo largo de todos los ensayos. En el caso de las células incubadas con fragmentos anti-CD13 y fragmentos anti-FcγRI, las bacterias han sido opsonizadas con fragmentos anti-IgG de ratón.

4.6. Efecto de la opsonización de las bacterias en la fagocitosis selectiva.

Dado que en el ensayo anterior observamos una disminución considerable con las muestras de fagocitosis selectiva, decidimos evaluar si la disminución se debía a que las células preincubadas con anticuerpo perdían su capacidad para reconocer a la bacteria o si con el simple hecho de opsonizar a las bacterias estábamos bloqueando todas las moléculas que normalmente inducen la fagocitosis y que por esta razón estábamos observando una inhibición de la fagocitosis. Para evaluar esto, realizamos experimentos en donde muestras de células solas o células preincubadas con anti-CD13 o anti- Fc γ RI, se incubaron durante 1.5 horas a 37°C en presencia de bacterias sin opsonizar u opsonizadas con biotina-estreptavidina-anti IgG biotinilado.

En la figura 12, se muestra una gráfica representativa en donde claramente se observa que en los 3 casos en que las bacterias están opsonizadas la fagocitosis se abate por completo, y no así en los casos en los que las células están incubadas con anticuerpo. De hecho, no hay diferencias significativas en los índices fagocíticos obtenidos entre las células solas y las células con anticuerpo por lo que descartamos que esta sea la razón por la que se inhibe la fagocitosis y mas bien se le atribuye a la opsonización de la bacteria.

Ya que la inhibición de la fagocitosis se la atribuimos a la opsonización de la bacteria, nos preguntamos si éstas al estar opsonizadas perdían su capacidad de adhesión a las células y que por este motivo no se estuviera observando la fagocitosis.

Por lo tanto en los mismos experimentos evaluamos la capacidad de las bacterias para adherirse a las células solas o a las células preincubadas con fragmentos anti-CD13 o anti-Fc γ RI. Para esto, analizamos el índice de adhesión el cual se obtuvo multiplicando el porcentaje de células positivas para la fluorescencia de FITC (M2) antes de agregar el azul tripano, por la media geométrica de fluorescencia para las células de esa misma región.

En la figura 13, se muestra una gráfica representativa en donde se observa que efectivamente la capacidad de adhesión de las bacterias opsonizadas cambia y que debido a este recubrimiento las bacterias no son reconocidas por los monocitos y como consecuencia no son fagocitadas.

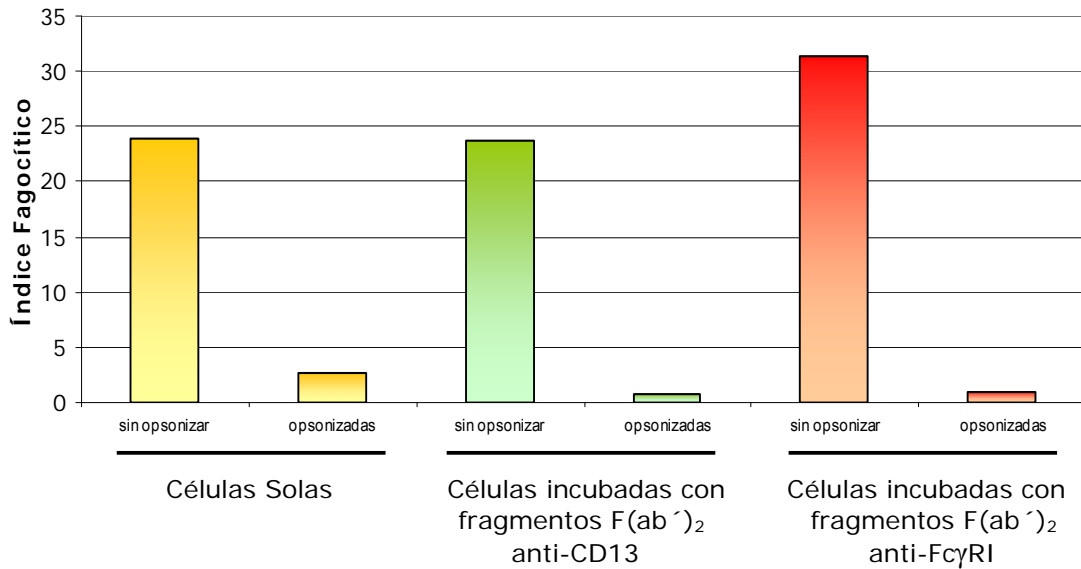


Figura 12. Efecto de la opsonización de las bacterias en la fagocitosis selectiva. En esta figura se observa una gráfica representativa en donde se comparan los índices fagocíticos obtenidos con las células solas y las células preincubadas con fragmentos anti-CD13 o anti-Fc γ RI al incubarlas con bacterias opsonizadas y sin opsonizar.

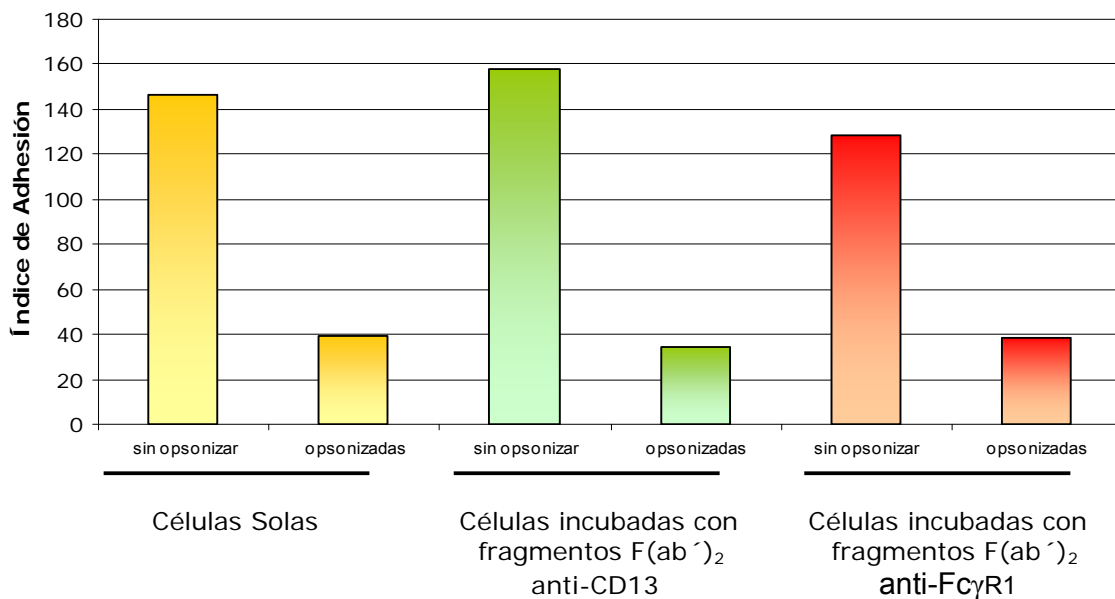


Figura 13. Evaluación de la adhesión de las bacterias opsonizadas a los monocitos. Esta figura es una gráfica representativa en donde se evalúa la capacidad de adhesión de las bacterias opsonizadas a las células solas y a las preincubadas con fragmentos anti-CD13 o anti-Fc γ RI. El índice de adhesión se obtuvo al multiplicar el porcentaje de células positivas para la fluorescencia de FITC (M2) antes de agregar el azul tripano, por la media geométrica de fluorescencia para esa misma región.

Capítulo V. Discusión

Para que la respuesta inmune actúe de una manera efectiva, es imprescindible que exista una comunicación muy estrecha entre todos los componentes que forman parte ella. Esta comunicación se basa principalmente en interacciones entre los receptores que presentan los distintos tipos celulares que conforman el sistema inmune y los ligandos específicos para cada uno de estos receptores. Cada interacción genera una compleja respuesta intracelular, la cual culmina con la activación de funciones celulares que favorecen la resolución de algún problema o el mantenimiento de la homeostasis. Sin embargo hay que tomar en cuenta, que las señales bioquímicas desencadenadas tras una interacción ligando-receptor no dependen exclusivamente de estos receptores sino también de otras señales que la célula reciba a través de otros receptores que puedan modular la intensidad de las señales.

La fagocitosis es un proceso esencial que lleva a cabo el sistema inmune y que se desencadena a partir de interacciones ligando-receptor. Los receptores que participan en ella, reconocen moléculas específicas en la superficie de la partícula que va a ser fagocitada y es a partir de esto que se disparan una serie de señales bioquímicas intracelulares que permiten internalizar a la partícula. Sin embargo, no todos los receptores en la membrana de los macrófagos que reconocen estructuras en la superficie de partículas son capaces de mediar la internalización de la partícula. Un ejemplo de esto, son los TLR's (Receptores tipo toll). Estos receptores reconocen estructuras muy conservadas en patógenos como son LPS, flagelina, CpG hipometilado, lipopéptidos, etc, y su manera de favorecer la fagocitosis es mediante la sobreexpresión de receptores fagocíticos como el receptor *scavenger A1* (Doyle, S.E. et al, 2004).

En cuanto a los receptores fagocíticos, se han estudiado mucho aquellos de la familia de los FcRs, los cuales reconocen la fracción Fc de las inmunoglobulinas que opsonizan al patógeno al igual que el receptor 1 de complemento (CR1) se une a C3b en la membrana del patógeno o el CR3 que une iC3b. Por otro lado se encuentra la familia de las lectinas tipo-C como lo son el receptor de manosa (RM) y el DC-SIGN. El RM reconoce principalmente residuos de manosa, fucosa o N-acetilglucosamina en la pared celular de bacterias, hongos o parásitos promoviendo su fagocitosis (Ezekowitz, R.A., 1998). También participa en la remoción de partículas endógenas que son tóxicas para el organismo como son la mieloperoxidasa o hidrolasas lisosomales (Gordon, S. & Barend, JM de Wet, 2007).

Por su parte, el DC-SIGN reconoce estructuras ramificadas de manosa en algunos tipos de bacterias, hongos, parásitos y actualmente se conocen algunos virus (van Kooyk & Geijtenbeek .2003).

Otros receptores fagocíticos conocidos, son aquellos de la familia *scavenger*. Estos receptores reconocen lipoproteínas modificadas, por lo que se encuentran en los macrófagos presentes en placas aterogénicas, al igual que reconocen fosfatidilserina en la membrana de células apoptóticas permitiendo la fagocitosis e impidiendo la inflamación. Dentro de esta familia de receptores se encuentran el receptor scavenger A1 (SR-A1), MARCO (receptor de macrófagos con estructura de colágeno) y el receptor-1 de lipoproteínas oxidadas de baja densidad tipo lectina (LOX-1) (Oka, K et al. 1998)(Peiser, L & Gordon, S. 2001). Por otro lado, el receptor MER, miembro de la familia de receptores tirosina cinasa (PTK) también reconoce fosfatidilserina en células apoptóticas favoreciendo su fagocitosis (Scott, R.S. et al. 2001).

Actualmente se sabe que los receptores SR-A1/II y MARCO no nada mas fagocitan células apoptóticas si no que juegan un papel importante en la inmunidad innata al reconocer estructuras en la superficie de bacterias gram positivas y negativas como son el lípido A del LPS, ácidos lipoteicoicos o CpG hipometilado (Peiser, L et al. 2002). Por su parte, se ha caracterizado a dectina-1 como un receptor fagocítico que reconoce β -glucanos presentes en la pared celular de hongos y bacterias (Brown, G. 2005).

En los últimos años se han descrito nuevos receptores que reconocen estructuras conservadas en la pared celular de diversos patógenos y es gracias a esto que desempeñan un rol muy importante en la respuesta inmune innata. Sin embargo, cabe notar que la diversidad de estos receptores es muy grande y la gama de ligandos a los que se pueden unir es cada vez más extensa.

Este punto es importante en el desarrollo de este trabajo, ya que CD13 es una molécula multifuncional, que se sabe participa en la adhesión celular y en la fagocitosis al cooperar con $Fc\gamma R_s$, lo que nos sugiere que también podría participar por sí solo como un receptor fagocítico o al mediar la adhesión favorecer la fagocitosis.

Hace un par de años se describió que en la línea celular U-937 (línea celular pro-monocítica) CD13 está constitutivamente unido a galectina-3, la cual es una lectina capaz de unir β -galactósidos, y que ésta molécula es esencial en la agregación homotípica de las células inducida a través de CD13 (Mina-Osorio et al .2006). Se piensa que galectina-3 pudiera estar participando en la agregación homotípica al

interactuar con otras moléculas de galectina-3, glicoproteínas u otros polisacáridos en las células vecinas, creando puentes y favoreciendo la adhesión.

En cuanto a las bacterias, se sabe que ciertos tipos expresan lectinas en las fimbrias tipo I y que éstas se unen a residuos de manosa de glicoproteínas en la membrana celular del hospedero y es así como se facilita la unión bacteria-célula (Madigan, M. et al 2004).

Con esto, podríamos pensar que en nuestro modelo CD13 pudiera estar de igual manera unido a galectina-3 y ésta última mediar la adhesión entre la célula monocítica y las bacterias al reconocer carbohidratos como galactosa o N-acetilgalactosamina que se encuentran principalmente en el polisacárido O y el núcleo del polisacárido del lipopolisacárido (LPS) que conforma la membrana externa de las bacterias Gram negativas.

Para determinar si CD13 participa ya sea como receptor fagocítico, favoreciendo la fagocitosis o incrementando la adhesión, se diseñó un modelo en el cual quisimos comparar la fagocitosis normal de una bacteria por una célula monocítica y la fagocitosis que se observaría si además de los ligandos naturales la bacteria también se pegara a la célula a través de CD13.

El primer reto al que nos enfrentamos, fue el de establecer un método objetivo, confiable y efectivo para cuantificar la fagocitosis de bacterias. Como ya lo mencionamos anteriormente, la observación microscópica de la fagocitosis es un poco subjetiva ya que depende exclusivamente del observador y se puede prestar a errores experimentales, además de que es necesario poder discriminar entre las bacterias que están adheridas a la superficie de la célula y aquellas que han sido ingeridas ya que al estar marcadas fluorescentemente, es imposible determinar por microscopía si están dentro o fuera. Para esto, se estandarizó un protocolo con el cual mediante citometría de flujo se pudo hacer esta discriminación fácilmente.

Una vez que se tuvo el protocolo adecuado, procedimos a evaluar el efecto que tenía sobre la fagocitosis el bloquear a CD13 con anticuerpos monoclonales. Como se puede ver en la figura 9, no encontramos diferencias significativas en la capacidad fagocítica de las células incubadas con y sin el anticuerpo. Esto indica que CD13 no tiene una participación importante en la fagocitosis de bacterias, dado que no observamos cambios significativos al bloquear esta molécula, sin embargo tampoco podemos excluir por completo su participación ya que probablemente la contribución es tan pequeña que se ve enmascarada por el reconocimiento a través de los distintos PAMPs que presentan las bacterias en su superficie. Otra cosa que hay que tomar en

cuenta, es que en el experimento se utilizó *E.coli* K12 la cual es una bacteria gram negativa con características estructurales específicas y tampoco podemos descartar que el comportamiento sea diferente al utilizar alguna otra especie bacteriana o al utilizar bacterias gram positivas.

Además es importante recordar que en este laboratorio, ya se describió que la coagregación de CD13 con Fc γ R's aumenta la fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados con IgG, por lo que con este experimento no podemos descartar aún que esto no suceda en las bacterias.

Ya que no se pudo corroborar la participación de CD13 con el experimento anterior, procedimos a realizar un ensayo de fagocitosis selectiva para CD13. Se utilizó el modelo de fagocitosis selectiva que está estandarizado en el laboratorio para la fagocitosis de eritrocitos de carnero pero modificando las concentraciones utilizadas de biotina y estreptavidina para opsonizar a la bacteria. Usamos como control una muestra en donde las células fueron incubadas con fragmentos anti-Fc γ RI ya que éste es un receptor fagocítico muy importante con el cual al realizar el reconocimiento exclusivamente a través de él esperábamos observar un efecto mayor.

En la figura 11, se observa que al realizar el ensayo de fagocitosis selectiva, la capacidad fagocítica de las células disminuye casi por completo al opsonizar la bacteria tanto en las células incubadas con fragmentos anti-CD13 como en las incubadas con fragmentos anti-Fc γ RI. Nosotros hubiéramos esperado una mayor fagocitosis en caso de que CD13 tuviera alguna participación o que simplemente se mantuviera constante la capacidad fagocítica en caso de que no participara, además de que nos sorprendió el hecho de que con el reconocimiento específico a través de Fc γ RI se observara el mismo efecto de inhibición.

Esto nos llevó a pensar que posiblemente la opsonización de las bacterias estaba afectando el pegado de éstas a las células y que por este motivo no estábamos observando fagocitosis.

Por esto, analizamos la capacidad de adhesión de las bacterias a las células y como se observa en la figura 13, la opsonización de éstas bloquea en más del 50% la capacidad de adhesión a las células. Lo que concluimos con esto, es que al opsonizar a la bacteria con tantos compuestos posiblemente estemos bloqueando las moléculas que son imprescindibles para que la bacteria pueda ser reconocida y se pueda adherir a una célula monocítica y es por esta razón que se observa un efecto de inhibición de la fagocitosis.

Con estos resultados, no podemos asegurar que CD13 no esté participando en la fagocitosis de bacterias ya sea como receptor fagocítico o como molécula de adhesión a través de galectina-3 y por lo tanto no se puede definir algo concluyente. Si quisiéramos contestar esta pregunta en un futuro, debemos de encontrar un sistema mas limpio, en donde el reconocimiento bacteria-célula sea a través de CD13 pero sin cubrirla por completo. Otra opción que tendríamos en un futuro, es trabajar con una línea celular que no exprese CD13 y de esta manera evaluar si la fagocitosis cambia de alguna manera.

Capítulo VI. Conclusiones

- ❖ Se logró estandarizar una técnica para llevar a cabo un ensayo de fagocitosis y analizarlo mediante citometría de flujo.
- ❖ El bloqueo de CD13 con fragmentos $F(ab')_2$ del anticuerpo monoclonal anti-CD13 no inhibe la capacidad fagocítica de las células monocíticas.
- ❖ El opsonizar bacterias con biotina-estreptavidina-anti-IgG biotinilado, modifica la capacidad de adhesión de las bacterias a las células monocíticas.
- ❖ La fagocitosis de bacterias por células monolíticas humanas se ve inhibida cuando la bacteria está opsonizada con biotina-estreptavidina-anti-IgG biotinilado.

Anexo I

I. Abreviaciones

TCR Siglas en inglés del receptor de linfocitos T

BCR Siglas en inglés del receptor de linfocitos B

PMN Célula polimorfonuclear (neutrófilo)

UFC Unidad Formadora de Colonia

PRR Siglas en inglés del receptor de reconocimiento de patrón

PAMP Siglas en inglés del patrón molecular asociado a patógeno

GM-CFU Unidad formadora de colonia de macrófagos y granulocitos

M-CSF Factor estimulador de colonias de macrófagos

LPS Lipopolisacárido

ROS Especies reactivas de oxígeno

NO Óxido nítrico

iNOS Sintasa inducible del óxido nítrico

TLR Receptor tipo Toll

MHC II Complejo mayor de histocompatibilidad clase II

IFN- γ Interferón gamma

IgG Inmunoglobulina G

FcRs Receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas

Fc γ Rs Receptores para la porción Fc de la IgG

ITAM Siglas en inglés de la secuencia de activación basada en tirosina

ITIM Siglas en inglés de la secuencia de inhibición basada en tirosina

FITC Fluoresceína Isotiocianato

Anexo II

Medios de Cultivo y Soluciones

2.1. Medio de cultivo

RPMI 1640 (GIBCO, Cat. No. 31800-022)

Disolver el contenido del sobre en aproximadamente 700 mL de agua milliq.

Agregar 2.2 g de NaHCO_3 (PM = 84.01, BAKER Cat. No. 3506-20)

Agregar 5.9575 g de Hepes (25mM)(PM = 238.3, SIGMA Cat. No. H-9136)

Agregar 7.8 μL de 2-mercaptoetanol (dilución 1:100 en agua milliq)(PM = 78.1, Research Organic Cat. No. 9607M)

Disolver perfectamente todos los componentes.

Ajustar el pH entre 7.2 y 7.4

Aforar a 1L

Esterilizar por filtración en membrana de $0.22\mu\text{m}$ de diámetro inmediatamente.

Dejar el medio en prueba de esterilidad por lo menos 3 días a temperatura ambiente.

Para complementar el medio:

-1mL de antibióticos 100X (10 000 U de Penicilina (SIGMA, Cat. No. P3092) y 1 mg de Estreptomicina (SIGMA, Cat. No. S-9137)) por cada 100mL de medio.

-1 mL de Glutamina 0.2 M por cada 100 mL de medio.

-0.5 mL de una solución 10 mM de aminoácidos no esenciales (GIBCO, Cat. No. 11140-050) por cada 100 mL de medio.

-0.5 mL de una solución 100 mM de piruvato de sodio (GIBCO, Cat. No. 11360-070) por cada 100 mL de medio.

-10 mL de SFB estéril por cada 100 mL de medio.

Conservar a 4°C protegido de la luz

2.2. Soluciones Amortiguadoras

*PBS 20X

En 1 L de agua milli-q

Agregar 7.2 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$ (2.6 mM)

Agregar 55.42 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 12 \text{H}_2\text{O}$ (7.74 mM)

175 g NaCl (0.16 mM)

Disolver perfectamente todos los componentes.

Ajustar el pH a 7.5 con lentejas de NaOH.

*Buffer de Carbonatos 0.1 M

En 1L de agua milli-q
Agregar 8.4 g de NaHCO_3
Disolver perfectamente bien
Ajustar pH a 9.5 con NaOH

*Glicina 0.2 M pH = 2.8

Para 500mL de agua milli-q
Pesar 7.507 g de Glicina
Disolver perfectamente bien
Ajustar pH con HCl

*Tris 10 mM - NaCl 150 mM pH = 7.8

Para 500 mL de agua milli-q
Pesar 0.6055 g de Tris (PM = 121.1)
Pesar 4.38 g de NaCl (PM = 58.44)
Disolver perfectamente bien
Ajustar pH a 7.8

*Tris 50 mM – EDTA 2mM pH = 7.1

Para 1L de agua milli-q
Pesar 6.055 g de Tris (PM = 121.1)
Pesar 0.74459 de EDTA (PM = 372.25)
Disolver perfectamente bien
Ajustar pH a 7.1

*Buffer de Citratos 0.1M

Para 1L de agua milli-q
Pesar 29.4 g de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PM = 294.1)
Disolver perfectamente bien
Ajustar el pH a 6 con HCl

2.3. Soluciones Utilizadas para la Inmunofluorescencia Indirecta

**Buffer de Lavados

Para 100 mL de PBS
Pesar 0.1 g de Azida de Sodio
Agregar 5 mL de SFB
Disolver y agitar perfectamente bien.

**Paraformaldehído (PFA)1%

Para 100 mL de PBS.

Pesar 1 g de PFA

Calentar el PBS a aprox. 45°C y agregar el PFA. Se puede agregar NaOH concentrada para acabar de disolver el PFA.

Una vez que se enfríe, ajustar el pH a 7.5 con HCl.

Proteger de la luz con papel aluminio.

2.4. Colorante para apagar la fluorescencia en el ensayo de fagocitosis

*Azul Tripano 1mg/mL pH = 4.5

Tomar 25 mL de azul tripano (GIBCO, 4mg/mL) y aforar a 100 mL con buffer de citratos.

Ajustar el pH a 4.5 con HCl

*Las soluciones se filtran en membranas de 0.22µm de diámetro y se conservan a 4°C.

**Las soluciones se filtran en membranas de 0.45 µm de diámetro y se conservan a 4°C.

2.5. Soluciones utilizadas en la Electroforesis en Gel de Poliacrilamida al 10%

- Buffer Superior 1X

Para 100 mL de agua milli-q
Pesar 6.05 g de Tris (0.5 M)
Pesar 0.4 g de SDS (0.4%)
Ajustar el pH a 6.8 con HCl

-Buffer Inferior 1X

Para 500 mL de agua milli-q
Pesar 90.65 g de Tris (1.5 M)
Pesar 2 g de SDS (0.4%)
Ajustar el pH a 8.8 con HCl

-Buffer de Corrida 1X

Para 1L de agua milli-q
Pesar 3 g de Tris
Pesar 14.48 g de Glicina
Pesar 1 g de SDS
NO SE AJUSTA EL pH

-Acrilamida-Bis 30%

Para 100 mL de agua milli-q
Pesar 30 g de acrilamida
Pesar 0.8 g de bis-acrilamida

-Persulfato de Amonio

Reactivo Comercial BIORAD Cat. No. 161-0700
Al 10% en agua milli-q

-TEMED

Reactivo Comercial BIORAD Cat. No. 161-0801

-*Sample Buffer* 4X (Condiciones No Reductoras)

Pesar 0.38 g de Trizma Base
Agregar 5 mL de glicerol
Pesar 2 g de SDS
Pesar 1.5 mg de azul de bromofenol
Agregar 23.5 mL de agua milli-q
Ajustar el pH a 6.8 con HCl

-*Sample Buffer* 4X (Condiciones Reductoras)

Tomar 10.5 mL del *Sample Buffer* 4X, Condiciones No Reductoras
Agregar 1.5 mL de 3-mercaptoetanol

-Solución para teñir geles

Metanol 40%
Ác. Acético 10%
Azul de Coomasie R-250 0.1%
Utilizar agua destilada

- Solución para desteñir geles

Etanol 30%
Ác. Acético 7%
Utilizar agua destilada

-Solución para secar geles

Etanol 50%
Ác. Acético 10%
Glicerol 3%
Utilizar agua destilada

2.6. Geles de Poliacrilamida al 10%

-Gel Inferior

4.5 mL de agua destilada
2.5 mL de Buffer Inferior
3.3 mL de Acrilamida al 30%
20 μ L de Persulfato de Amonio
10 μ L de TEMED

-Gel Superior

3 mL de agua destilada
1.25 mL de Buffer Superior
666 μ L de Acrilamida al 30%
20 μ L de Persulfato de Amonio
10 μ L de TEMED

-Sellador de Cámara

350 μ L de Acrilamida al 30%
450 μ L de agua destilada
270 μ L de Buffer Inferior
20 μ L de Persulfato
10 μ L de TEMED

Anexo III.

Análisis de Varianza en bloques

- Inhibición de la fagocitosis bloqueando CD13 con anticuerpo monoclonal anti-CD13 completo.

Univariate Analysis of Variance

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: **Índice Fagocítico**

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1392.104	4	348.026	8.603	.030
Intercept	2849.780	1	2849.780	70.442	.001
EXP	248.354	2	124.177	3.069	.156
F3	1143.750	2	571.875	14.136	.015
Error	161.822	4	40.456		
Total	4403.707	9			
Corrected Total	1553.926	8			

a R Squared = .896 (Adjusted R Squared = .792)

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons
Dependent Variable: **Índice Fagocítico**
Tukey HSD

(I) F3	(J) F3	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
37°	4°	22.1167	5.1933	.028	3.6085	40.6249
	antiCD13 completo	-3.2600	5.1933	.814	-21.7682	15.2482
4°	37°	-22.1167	5.1933	.028	-40.6249	-3.6085
	antiCD13 completo	-25.3767	5.1933	.018	-43.8849	-6.8685
antiCD13completo	37°	3.2600	5.1933	.814	-15.2482	21.7682
	4°	25.3767	5.1933	.018	6.8685	43.8849

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Tukey HSD

	N	Subset	
F3		1	2
4°	3	1.9633	
37°	3		24.0800
antiCD13completo	3		27.3400
Sig.		1.000	.814

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 40.456.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b Alpha = .05.

- Inhibición de la fagocitosis bloqueando CD13 con fragmentos $F(ab')_2$ del anticuerpo monoclonal anti-CD13.

Univariate Analysis of Variance

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: **Índice Fagocítico**

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1090.750	4	272.687	6.425	.050
Intercept	2269.570	1	2269.570	53.472	.002
EXP	241.698	2	120.849	2.847	.170
F3	849.051	2	424.526	10.002	.028
Error	169.777	4	42.444		
Total	3530.096	9			
Corrected Total	1260.527	8			

a R Squared = .865 (Adjusted R Squared = .731)

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons
 Dependent Variable: **Índice Fagocítico**
 Tukey HSD

		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) F3	(J) F3				Lower Bound	Upper Bound
37°	4°	19.8867	5.3194	.043	.9290	38.8443
	F(ab') ₂	-1.3667	5.3194	.965	-20.3243	17.5910
4°	37°	-19.8867	5.3194	.043	-38.8443	-.9290
	F(ab') ₂	-21.2533	5.3194	.035	-40.2110	-2.2957
F(ab') ₂	37°	1.3667	5.3194	.965	-17.5910	20.3243
	4°	21.2533	5.3194	.035	2.2957	40.2110

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Tukey HSD

	N	Subset	
F3		1	2
4°	3	2.1667	
37°	3		22.0533
F(ab') ₂	3		23.4200
Sig.		1.000	.965

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 42.444.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b Alpha = .05

Referencias

- **Abbas A.** & Lichtman A.H. Cellular and Molecular Immunology, 5th edition. Ed. Elsevier Saunders. USA 2005. pag 4-5, 285.
- **Aderem A.** & Underhill D. 1999. Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages. *Annual Reviews in Immunology* 17:593-623
- **Berton G., Mócsai A.** & Lowell C.A. 2005. Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation. *TRENDS in Immunology* 26, No. 4
- **Borregaard,** Antibiotic Molecules: Intracellular, *Encyclopedia of Life Sciences*, 2005.
- **Braesch-Andersen, S.** & Stamenkovic, I. 1994. Sialylation of the b lymphocyte molecule CD22 by α 2,6-sialyltransferase is implicated in the regulation of CD22 mediated adhesion. *J. Biol. Chem.* 269, 11783-11786.
- **Brown, G.** 2005. Dectin-1: A signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature Reviews* 6, 33-43
- **Brown, K., Mookherjee, N.** & Hancock, R.E. 2007. Antimicrobial Host Defence, Peptides and Proteins. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- **Chomarat, P., Rissoan, M.C., Pin, J.J., Banchereau, J.** & Miossec, P. (1995). Contribution of IL-1, CD14 and CD13 in the increased IL-6 production induced by *in vitro* monocyte-synoviocyte interactions. *J. Immunol.* 155, 3645-3652.
- **Crofton, R.W.** Diesselhoff-den Dulk, M.M. & van Furth R. 1978. The origin, kinetics and characteristics of the Kupffer cells in the normal steady state. *Journal of Experimental Medicine* 148: 1-17
- **Doyle, S.E, O'Connell RM, Miranda GA, Vaidya SA, Chow EK, Liu PT, Suzuki S, Suzuki N, Modlin RL, Yeh WC, Lane TF & Cheng G.** 2004. Toll-like Receptors

Induce a Phagocytic Gene Program through p38. *Journal of Experimental Medicine* 199, 81-90

- **Eloranta**, M.L. & Alm G.V.1999. Splenic marginal metallophilic macrophages and marginal zones macrophages are the major interferon- α/β producers in mice upon intravenous challenge with herpes simplex virus. *Scand. J. Immunol.* 49: 391-394
- **Ezekowitz**, R.A. & Stahl, P.D. 1998. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defence, *Curr. Opin. Immunol.* 10, 50-55
- **Geijtenbeek**, T.B. ,Groot PC, Nolte MA, van Vliet SJ, Gangaram-Panday ST, van Duijnhoven GC, Kraal G, van Oosterhout AJ & van Kooyk Y. 2002. Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens *in vivo*. *Blood* 100: 2908-2916.
- **Gordon**, S. 2003. Alternative Activation of Macrophages. *Nature Reviews in Immunology* 3:23-35.
- **Gordon**, S. & Barend JM de Wet.2007.Pattern Recognition Receptors. *Encyclopedia of Life Sciences* 1-7
- **Gordon** S. & Taylor P.R.2005. Monocyte and Macrophage Heterogeneity. *Nature Reviews in Immunology* 5: 953-964.
- **Griffin** Jr FM, Griffin JA, Leider JE & Silverstein SC.1975. Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. *Journal of Experimental Medicine* 142: 1263-1282.
- **Hashida**, H, Takabayashi A, Kanai M, Adachi M, Kondo K, Kohno N, Yamaoka Y & Miyake M.2002. Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology* 122, 376-386.

- **Hesse**, M, Modolell M, La Flamme A, Schito M, Fuentes JM, Allen W. Cheever, E, Pearce J, & Wynn TH. 2001. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type1/type2 cytokines *in vivo*: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J. Immunol.* 167:6533-6544.
- **Hoffmann**, T., Faust, J., Neubert, K. & Ansorge, S. 1993. Dipeptidyl peptidase IV (CD26) and aminopeptidase N (CD13) catalyzed hydrolysis of cytokines and peptides with N-terminal cytokine sequences. *FEBS letters*, 336, 61-64.
- **Honey** K. & Rudensky A.Y., 2003, Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation, *Nature Reviews in Immunology*, 3: 472-482.
- **Hooper**, N. 1994. Families of zinc metalloproteases. *FEBS letters* 354, 1-6.
- **Imai**, T, Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M, Wang J, Gray PW, Matsushima K & Yoshie O. 1999. Selective recruitment of CCR4-bearing T_H2 cells toward antigen-presenting cells by the CC-chemokines, thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int. Immunol.* 11:81-88.
- **Janeway** CAJ.1992.The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunology Today* 13:11-16
- **Kanayama**, N., Kajiwara, Y., Goto, J., el Maraduy, E., Maehara, K., Andou, K. & Terao, T. 1995. Inactivation of interleukin-8 by aminopeptidase N (CD13). *J. Leukoc. Biol.* 57, 129-134.
- **Madigan**, M., Martinko, J. & Parker, J. Biología de los microorganismos 10^a edición. Ed. Pearson.2004.
- **McIntyre**, E.A., Roberts, P.J., Jones, M., van der Schoot, C.V.E., Favalaro, E.J. & Tidman, N. 1989. Activation of human monocytes occurs on cross-linking monocytic antigens to an Fc receptor. *J. Immunol.* 142, 2377-2383.

- **Mina-Osorio**, P. & Ortega, E. 2004. Signal Regulators in FcR-mediated activation of leukocytes?. *Trends in Immunology* ,25, 529-535.
- **Mina-Osorio**, P. & Ortega, E. 2005. Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγRs in human monocytes. *J. Leuk. Biol.* 77, 1008-1017.
- **Mina-Osorio**, P., Shapiro, L.H. & Ortega, E. 2006. CD13 in cell adhesión: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells. *J. Leuk. Biol.* 79, 719-730.
- **Mina-Osorio**, P., Soto-Cruz, I., & Ortega, E. 2006. A role for galectin-3 in CD13-mediated homotypic aggregation of monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 352, 605-610.
- **Murphy** K., Travers P. & Walport M. Janeway's Immunobiology, 7th edition. Ed. Garland Science. USA 2008.
- **Myeong Sup** L. & Young-Joon K.2007. Signaling Pathways Downstream of Pattern-Recognition Receptors and Their Cross Talk. *Annual Reviews in Biochemistry* 76:447-480.
- **Oka**, K, Sawamura T, Kikuta K, Itokawa S, Kume N, Kita T & Masaki T. 1998. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9535-9540.
- **Oldenborg**, P.A, Gresham H.D., & Lindberg F.P. 2001. CD47-signal regulatory protein α (SIRP α) regulates Fcγ and complement receptor-mediated phagocytosis. *J. Exp. Med.* 193, 855-861.
- **Olsen**, J., cowell, G.M. & Konigshofer, E. 1988. Complete aminoacid sequence of human intestinal aminopeptidase N as deduced from cloned cDNA. *FEBS letters* 238, 307-314.

- **Olsen**, J., Kokholm, K. Noren, O. & Sjöstrom, H. 1997. Structure and Expression of aminopeptidase N. *Adv. Exp. Med. Biol.* 421, 47-57.
- **Paul**, S, Taylor LS, Stansbury EK & McVicar DW. 2000. Myeloid specific human CD33 is an inhibitory receptor with differential ITIM function in recruiting the phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Blood* 96, 483-490.
- **Peiser**, L. & Gordon, S. 2001. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect.* 3, 149-159.
- **Peiser**, L. Mukhopadhyay, S. & Gordon, S. 2002. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 123-128
- **Peracchia** M.T., Barratt G. & Couvreur P.2001. Mononuclear Phagocytic System. *Encyclopedia of Life Sciences.*
- **Riemann**, D., Kehlen, A. & Langner, J. 1999. CD13 not just a marker in leukemia typing. *Immunol. Today*, 20, 83-88.
- **Roodman** D.G. 1999. Cell Biology of the Osteoclast. *Experimental Hematology*, 27: 1229-1241.
- **Rusell** D. 2001. Phagocytosis . *Encyclopedia of Life Sciences*
- **Salmi**, M. & Jalkanen, S. 2005. Cell surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 760-771.
- **Scott**, R.S, McMahon EJ, Pop SM, Reap EA, Caricchio R, Cohen PL, Earp HS & Matsushima GK. 2001. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 411, 207-211.
- **Stein**, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. 1992. IL-4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* 176: 287-292.

- **Swanson** JA, & Baer SC.1995. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends in Cell Biology* 5:89-93
- **Tokuda**, N. & Levy, R. 1996. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates phagocytosis but suppresses HLA-DR and CD13 antigen expression in human mononuclear phagocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 211, 244-250.
- **Underhill** D.M. & Gantner B. 2004. Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and Infection* 6:1368-1373
- **van Kooyk**, Y. & Geijtenbeek, T.B.H. 2003. DC-SIGN: Escape mechanism for pathogens. *Nature Reviews* 3, 697-709.
- **Van Vugt** M.J. & Van de Winkel J.GJ.2001.Fc Receptors. *Encyclopedia of Life Sciences.*
- **Vidarsson** G. & Van de Winkel JGJ.1998. Fc receptor and Complement receptor mediated phagocytosis in host defence. *Current Opinion in Infectious Diseases* 11:271-278.
- **Vieira**, O.V, Bucci C, Harrison RE, Trimble WS, Lanzetti L, Gruenberg J, Schreiber AD, Stahl PD & Grinstein S. 2003. Modulation of Rab5 and Rab7 Recruitment to Phagosomes by Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Molecular and Cellular Biology* 23: 2501-2514.
- **Ward**, P.E., Benter, I.F., Dick, L. & Wilk, S. 1990. Metabolism of vasoactive peptides by plasma and purified renal aminopeptidase. *Mol. Biochem. Pharmacol.* 40, 1725-1732.
- **Wink** D.A. 2002. Immune Defence: Role of Reactive Nitrogen Intermediates. *Encyclopedia of Life Sciences.*

- **Yeager**, C.L., Ashmun, R.A., Williams, R.K., Gaudelicko, C.B., Shapiro, L.H., Look, A.T. & Holmes, K.V.1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*. 357, 420-422.
- **Yu**, X.J., Luo, C., Lin, J.C., Hao, P., He, Y.Y., Guo, Z.M., Qin, L., Su, J., Liu, B.S., Huang, Y., Nan, P., Li, C.S., Xiong, B., Luo, X.M., Zhao, G.P., Pei, G., Chen, K.X., Shen, X., Shen, J.H., Zou, J.P., He, W.Z., Shi, T.L., Zhong, Y., Jiang, H.L. & Li, Y.X. 2003. Putative hAPN receptor binding sites in SARS-CoV spike protein. *Acta Pharmacol. Sin.* 24, 481-488.