



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**PAPEL DE LA AMINOPEPTIDASA N (CD13) EN  
LA INDUCCIÓN DEL ESTALLIDO RESPIRATORIO  
EN MACRÓFAGOS DERIVADOS DE  
MONOCITOS HUMANOS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**RIVERA FUENTES ANA DIANA**



**MÉXICO, D.F.**

**2011**



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: Rodolfo Pastelín Palacios**

**VOCAL:**               **Profesor: Saturnino de León Chapa**

**SECRETARIO:**       **Profesor: Enrique Ortega Soto**

**1er. SUPLENTE:**      **Profesor: Patricia Elvira Berrón Ruiz**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: Julio Cesar Martínez Álvarez**

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

---

Dra. Mónica Iraís Villaseñor Cardoso

Supervisor técnico

---

Ana Diana Rivera Fuentes

Sustentante

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas con el apoyo económico de CONACYT (proyecto 80301) y de DGAPA, UNAM (proyecto 222008). Recibí una beca otorgada por CONACYT (número de becario 15240).

Agradezco a la M. en IBB. Claudia A. Garay Canales por su apoyo técnico a lo largo de este trabajo al igual que a cDra. Dulce Aurora Frausto del Río.

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

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por formarme como la QFB que ahora soy.

A mis padres, Magdalena y Antonio, por permitirme cumplir este sueño, por la persona en la que ahora me he convertido. Por su cuidado, apoyo y amor incondicional. Esta tesis es para ustedes, MUCHAS GRACIAS.

A mis hermanos, Belém y Hugo, que no importando la distancia o las diferencias, han sido un importante apoyo para que todo esto pase, donando las experiencias ya vividas y las sonrisas.

Al Dr. Enrique Ortega por colaborar con mi formación como estudiante y docente, por haberme dado la oportunidad de trabajar con él y aprender de él. Por su apoyo y confianza.

A aquellos profesores que se convirtieron en grandes amigos: a la profesora Socorro Alpizar, al profesor Raúl Garza y al profesor José Landeros; que siempre tuvieron una palabra de aliento y un consejo para continuar con este camino.

A todos los integrantes del laboratorio que siempre participaron muy amablemente en la elaboración de este trabajo, destacando a Iraís por todos sus esfuerzos, a Clau mi "madre académica", Aurora, la Dra. Soto, Sr. Raquel, Ileana, y todos los alumnos que cruzaron alguna vez por este recinto del saber.

A esas mujeres que me han soportado por años: Karla y Susy; a aquellos hombres que siempre han tenido un buen consejo y mucha disposición de escuchar: Iván, Jesús, Rodrigo.

A las QFB's que se formaron conmigo: Laura, Piby, Viry y Bochm, que trajeron momentos excelentes durante este largo camino, y alimentaron de preciadas experiencias mi vida. A mi compañera de laboratorio por casi dos años con la que he luchado arduamente para convertirnos en QFB's: Sujhey.

A todos aquellos químicos y demás profesionistas: Erika, Melissa, las Viris, Rivero, Roberto, Jair, Marco, Ingrid, Adriana, Peter, Paulina, Adán, Carlos, Samuel, Leticia, Esteban, a Carlitos Koala que me ha dado fuerzas para seguir y a todos aquellos que formaron o forman parte de mi vida.

Gracias a todos porque colaboraron con uno o varios granitos de arena para construir esto, por las palabras, las horas, los abrazos, el apoyo.

*Vale más actuar exponiéndose a arrepentirse de ello, que arrepentirse de no haber hecho nada. BG*

<b>1. INDICE</b>	
<b>2. RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>4. MARCO TEORICO</b> .....	<b>10</b>
4.1 MACRÓFAGOS .....	11
4.1.1 <i>Fagocitosis y reconocimiento de lo propio vs lo extraño</i> .....	12
4.1.2 <i>Mecanismos antimicrobianos</i> .....	13
4.1.3 <i>Presentación de antígeno</i> .....	13
4.1.4 <i>Producción de citocinas</i> .....	13
4.2 RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO EN LEUCOCITOS .....	14
4.2.1 <i>Receptores de la fracción constante de inmunoglobulinas G (FcγRs)</i> ... 14	
4.3 ESTALLIDO RESPIRATORIO .....	20
4.3.1 <i>Métodos de detección de especies reactivas de oxígeno</i> .....	24
4.4 AMINOPEPTIDASA N (CD13) .....	30
4.4.1 <i>Actividad enzimática</i> .....	30
4.4.2 <i>Endocitosis</i> .....	31
4.4.3 <i>Participación como molécula transductora de señales</i> .....	31
4.4.4 <i>Fagocitosis por CD13</i> .....	31
<b>5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>34</b>
<b>6. HIPÓTESIS</b> .....	<b>34</b>
<b>7. OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>8. METODOLOGÍA</b> .....	<b>35</b>
8.1 OBTENCIÓN DE MONOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA ...	35
8.2 DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS A MACRÓFAGOS .....	36
8.3 DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DE MACRÓFAGOS .....	36
8.3.1 <i>Inmunofluorescencia directa</i> .....	37
8.4 EXPRESIÓN DE RECEPTORES EN MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE MONOCITOS.....	37
8.4.1 <i>Inmunofluorescencia indirecta</i> .....	37
8.5 SENSIBILIZACIÓN DE ERITROCITOS CON TRINITROBENCEN SULFONATO (TNBS) .....	38
8.6 HEMAGLUTINACIÓN .....	38
8.7 MARCAJE DE ERITROCITOS DE CARNERO CON F(AB) <sub>2</sub> CABRA ANTI RATÓN .....	39
8.8 ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO .....	40

8.9 CUANTIFICACIÓN DE LA FAGOCITOSIS DE ERITROCITOS DE CARNERO POR DIAMINOBENCIDINA (DAB) .....	41
<b>9. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
9.1 PURIFICACIÓN DE MONOCITOS .....	43
9.2 REDUCCIÓN DE NITROAZUL DE TETRAZOLIO POR LA FAGOCITOSIS DE ERITROCITOS DE CARNERO OPSONIZADOS CON ANTICUERPOS ANTI-DNP .....	43
9.3 CITOMETRÍA DE FLUJO.....	44
9.3.1 <i>Expresión de FcγRI, FcγRII y CD13 en macrófagos derivados de monocitos .....</i>	<i>44</i>
9.3.2 <i>Ensayos de producción de especies reactivas de oxígeno con estímulo por PMA. Detectados por citometría de flujo. ....</i>	<i>45</i>
9.4 ENSAYOS DE PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO DETECTADOS POR FLUOROMETRÍA .....	48
9.4.1 <i>Producción de ROS acoplada a la fagocitosis de partículas a través de receptores Fcγ .....</i>	<i>48</i>
9.4.2 <i>Producción de ROS inducida por el entrecruzamiento de receptores... 50</i>	<i>50</i>
9.4.3 <i>Producción de ROS inducida por fagocitosis específica a través de receptores Fcγ. ....</i>	<i>51</i>
9.4.4 <i>Cinéticas de producción de ROS por fagocitosis específica.....</i>	<i>52</i>
9.5 RELACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ROS CON LA FAGOCITOSIS.....	62
<b>10. DISCUSIÓN.....</b>	<b>64</b>
10.1 FAGOCITOSIS DE PARTÍCULAS A TRAVÉS DE RECEPTORES PARA LA FRACCIÓN CONTANTE DE LOS ANTICUERPOS.....	66
10.2 PRODUCCIÓN DE ROS INDUCIDA POR EL ENTRECruzAMIENTO DE RECEPTORES .....	67
10.3 PRODUCCIÓN DE ROS POR FAGOCITOSIS ESPECÍFICA.....	68
10.3.1 <i>CD13.....</i>	<i>69</i>
10.3.2 <i>FcγRI y FcγRII .....</i>	<i>70</i>
<b>11. CONCLUSIONES.....</b>	<b>74</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>75</b>

## 2. RESUMEN

CD13 es una ectoenzima ampliamente expresada en células del linaje mieloide, que ha demostrado participar en varias funciones en forma independiente de su actividad enzimática. También se demostró que CD13 es capaz de mediar fagocitosis e incrementar la fagocitosis mediada por Fc $\gamma$ RI de forma significativa. El objetivo de este trabajo es determinar si, al igual que otros receptores fagocíticos, CD13 es capaz de llevar a cabo otras funciones efectoras, como la inducción del estallido respiratorio, y/o si puede tener una cooperación con los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII, en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la NADPH oxidasa. Para esto, se llevó a cabo el entrecruzamiento de los receptores Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y CD13 en macrófagos derivados de monocitos humanos y se determinó la producción de ROS por métodos fluorescentes. El entrecruzamiento de Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y CD13, con anticuerpos monoclonales y fragmentos F(ab) $'_2$  solubles, no es suficiente para generar una producción de ROS significativa, lo cual si se logra induciendo la fagocitosis específica a través de Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y CD13, de eritrocitos de carnero recubiertos con F(ab) $'_2$  biotinilados.

Las curvas de producción de ROS demostraron que la generación de ROS es acumulativa durante al menos 80 minutos, notándose diferencias significativas a partir de los 20 minutos hasta el final de la cinética. CD13 es capaz de inducir el estallido respiratorio después de la fagocitosis de eritrocitos, con valores de  $\Delta$ URF similares a los producidos por el Fc $\gamma$ RII, que es un receptor reportado como inductor del estallido respiratorio dependiente de la NADPH oxidasa. El Fc $\gamma$ RI fue el receptor que generó una mayor producción de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, la interacción de CD13 con los receptores Fc $\gamma$  no conlleva a una cooperación funcional. Mediante microscopia de fluorescencia se observó que la producción de especies ROS, en algunos casos es más intensa en la zona del eritrocito fagocitado. Lo anterior sugiere que la producción de especies reactivas de oxígeno por CD13, Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII es un proceso compartimentalizado en el fagosoma.

### 3. INTRODUCCIÓN

La comunicación del interior de una célula con el medio que la rodea es mediada por diferentes moléculas (receptores) que se encuentran en la superficie de la membrana celular. Las células del sistema inmune poseen receptores de membrana con los que monitorean el ambiente que las rodea para reconocer moléculas extrañas que pudieran representar un peligro para el organismo, y poner en marcha mecanismos enfocados a la eliminación. Un grupo particular de células pertenecientes a los leucocitos fueron descritas por su gran capacidad para eliminar a organismos patógenos al ingerirlos por un proceso celular llamado fagocitosis, por lo que se les denomina fagocitos profesionales. Los fagocitos profesionales se encuentran a su vez clasificados en mononucleares (macrófagos y células dendríticas) y los polimorfonucleares (neutrófilos). Estas células fagocíticas poseen receptores fagocíticos que pueden reconocer directamente estructuras de la superficie del microorganismo, así como receptores para opsoninas, que son moléculas propias que han reconocido estructuras sobre la superficie del microorganismo y permiten a la célula fagocitarlo. Entre estos receptores tenemos receptores para factores de complemento y receptores para anticuerpos. Este último grupo de receptores son llamados FcR por reconocer la fracción constante de los anticuerpos (Fc), y median diferentes funciones celulares que colaboran en la eliminación del patógeno fagocitado. Una de las funciones celulares que se presentan con mayor rapidez, después del contacto con el patógeno, es el estallido respiratorio, el cual es un proceso enzimático que resulta en la generación de especies reactivas de oxígeno a partir del anión superóxido, que colaboran con la eliminación del patógeno. Varios receptores pueden inducir el estallido respiratorio, principalmente los receptores que se han descrito como fagocíticos. CD13 es una molécula ampliamente expresada en leucocitos de origen mieloide, como macrófagos y células dendríticas; CD13 ha sorprendido por el amplio rango de funciones celulares en las que participa. Una función de relevante interés es su participación como posible receptor fagocítico y como co-receptor en la fagocitosis mediada por FcγR's.

#### 4. MARCO TEORICO

El sistema inmune es un conjunto de células y moléculas responsables de la protección de un organismo contra agentes patógenos.<sup>5</sup> Con base a la temporalidad y especificidad de la respuesta inmune, entre otras características, para su estudio se ha dividido en dos grandes ramas: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. La respuesta inmune innata es aquella que se presenta de forma inmediata como primera línea de defensa, y está integrada por componentes celulares y humorales. En vertebrados la respuesta inmune innata celular es ampliamente dependiente de células de la estirpe mieoide.<sup>50</sup>

Todos los leucocitos o glóbulos blancos son producto de la hematopoyesis, proceso por el cual una célula madre con la capacidad de autorenovarse da origen a otros tipos celulares, generando precursores de tipo mieoide o linfoide. Un precursor mieoide genera células comprometidas a la estirpe eritroide y a diferentes tipos de leucocitos. Una unidad formadora de colonias granulocíticas-monocíticas (UF-CGM) bajo la influencia de varias citocinas da origen a monoblastos, promonocitos y monocitos maduros que están en la circulación.<sup>2</sup> La diferenciación mieoide terminal exhibe una considerable heterogeneidad funcional y fenotípica. Un complejo y dinámico patrón de genes que son expresados bajo la influencia de citocinas y de interacciones célula-célula, dirigen la diferenciación a dos vías principales representativas, por una parte a macrófagos (MΦ) y por otra a células dendríticas (CD) (Figura 1).<sup>1</sup> Estas células de origen mieoide forman parte de un sistema nombrado como fagocitos mononucleares.<sup>50</sup>

Una parte importante de MΦ y CD residentes en tejido proviene de los monocitos circulantes en sangre. En respuesta a señales quimiotácticas, los monocitos se adhieren a receptores de superficie en células endoteliales y son capaces de cruzar el endotelio para llegar a los tejidos, un proceso conocido como migración transendotelial. El microambiente local en los tejidos, la adherencia y factores específicos, llevan al monocito a perder su capacidad de dividirse y empezar su diferenciación para desempeñar funciones particulares.<sup>2</sup> La influencia de un microambiente específico permite la diferenciación a MΦ o CD. El progresivo esclarecimiento de estos procesos complejos ha permitido la

generación *in vitro* de estos tipos celulares a partir de monocitos, cultivándolos bajo diferentes condiciones.<sup>1</sup>

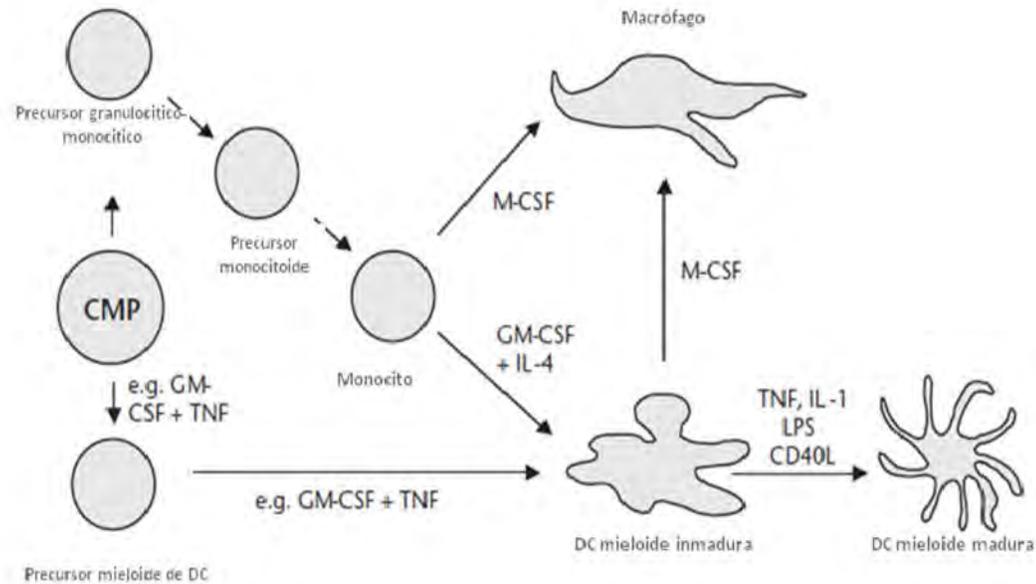


Figura1. Relación de monocitos, macrófagos y DC mieloides. CMPs: célula progenitora común mielode.<sup>4</sup>

Las habilidades de la respuesta inmune puede resumirse de la siguiente forma: 1. Reconocimiento de una amplia gama de agentes patógenos, 2. Eliminación de los patógenos que son reconocidos y 3. Tolerancia a lo propio.<sup>50</sup> En los siguientes párrafos, me referiré a los macrófagos, que son células capaces de eliminar a patógenos, y se hará mención de algunos receptores de reconocimiento a patógenos presentes en este tipo celular.

#### 4.1 MACRÓFAGOS

Alrededor de 1882 las observaciones del biólogo ruso Elie Metchnikoff, lo llevaron a acuñar el término “macrófago” para referirse a algunos tipos celulares hallados en invertebrados que son capaces de ingerir y eliminar materia viva o no viva de sus alrededores. Estas observaciones le permitieron postular, que en organismos superiores, existían células en varios órganos y superficies epiteliales capaces de remover material extraño, así como células senescentes o que contuvieran algún tipo de microorganismo invasor.<sup>4</sup>

Los macrófagos se generan de un precursor en sangre (monocitos), que después de adherirse y migrar a través del endotelio y capilares llegan a los

órganos, en donde se diferencian a macrófagos residentes de tejidos. Este tipo celular es abundante en tejido linfático y también en otros órganos como hueso, sistema nervioso central, riñón, hígado, pulmón, bazo, etc, donde se les designa con diferentes nombres dependiendo de su ubicación anatómica.<sup>4</sup> El número de macrófagos en los tejidos no es constante, este número puede aumentar considerablemente a consecuencia de un proceso inflamatorio o infeccioso, el cual induce el reclutamiento de monocitos sanguíneos.

Morfológicamente los macrófagos tienen un diámetro de 25-50 $\mu$ m, son alargados e irregulares, su núcleo es excéntrico, encontrándose en menor proporción con respecto al citoplasma, y se encuentra rodeado claramente por un definido complejo de Golgi. Tienen una importante actividad lisosomal, debido a la alta producción de enzimas hidrolíticas como fosfatasas, lisozimas y esterases no específicas.<sup>2</sup> Cuando se observa en el microscopio óptico, o bien con mayor resolución en el electrónico, se puede observar una gran presencia de vacuolas, más aún si estas células han llevado a cabo un proceso de fagocitosis.

Los M $\Phi$  participan tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa realizando diversas funciones que se mencionan a continuación:<sup>4</sup>

#### **4.1.1 Fagocitosis y reconocimiento de lo propio vs lo extraño**

Siendo células que participan muy activamente en varios procesos de la respuesta inmune, los macrófagos contienen una extensa variedad de receptores de superficie que permiten el reconocimiento de microorganismos. Entre estos receptores están los receptores similares a Toll (TLRs; *Toll* like receptor) que reconocen directamente estructuras conservadas en los microorganismos. Esta interacción dirige una fuerte respuesta inmune con la liberación de citocinas pro-inflamatorias y moléculas efectoras antimicrobianas.<sup>4</sup> Los macrófagos también expresan receptores que reconocen a microorganismos opsonizados por componentes de complemento como C3b, C3bi, C4b, u otras opsoninas como las inmunoglobulinas (IgG) y lectinas de unión a manosa.<sup>4</sup> Los receptores que reconocen estas opsoninas son considerados receptores fagocíticos y participan en esta importante función del M $\Phi$ .

#### 4.1.2 Mecanismos antimicrobianos

Los patógenos pueden internalizarse en el MΦ por medio de fagocitosis o por una invasión activa (como *Toxoplasma gondii*).<sup>4</sup> Una vez dentro estimulan la producción de moléculas o radicales altamente tóxicos que serán capaces de inhibir el crecimiento o mediar la muerte del microbio internalizado. El macrófago tiene la capacidad de producir amplias cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de especies reactivas de nitrógeno (RNS), lo cual le confiere una alta capacidad microbicida; la presencia de estas especies produce oxidación de estructuras microbianas o la depleción de ciertos aminoácidos esenciales como la arginina,<sup>4</sup> y de esta manera participa en la muerte del patógeno.

#### 4.1.3 Presentación de antígeno

Junto con las células dendríticas y los linfocitos B, los macrófagos son considerados como células presentadoras de antígeno (APC: antigen-presenting cell) que tienen la capacidad de presentar antígeno en el contexto de moléculas de MHC-II a linfocitos T CD4<sup>+</sup> efectoras,<sup>5</sup> además de presentar como cualquier célula nucleada antígenos citosólicos en el contexto de moléculas del MHC-I. Esta capacidad estimuladora de linfocitos T es mucho menor que la que tiene una célula dendrítica madura.<sup>4</sup> Los macrófagos sólo pueden presentar antígenos eficientemente a linfocitos T de memoria o efectoras, por su baja expresión de moléculas de coestimulación como CD80 y CD86.

#### 4.1.4 Producción de citocinas

El contacto célula-célula, como ocurriría con la interacción con linfocitos T o el reconocimiento de estructuras bacterianas por receptores específicos, como el LPS por TLR4, estimula la producción de citocinas en los macrófagos, que son considerados como una fuente importante de estas moléculas solubles. Basados en su función, las citocinas que puede secretar un macrófago pueden clasificarse en cuatro tipos: 1) Citocinas que median una respuesta inflamatoria y ayudan al reclutamiento de células a sitios de inflamación (como TNF-α, IL-8, quimiocinas CXC, entre otras), 2) Citocinas que colaboran a la activación de linfocitos T o células NK (ej, IL-1, IL-12, IL-18, IL-23), 3) Citocinas que ayudan a la propia activación del macrófago por un proceso de retroalimentación (IL-1, TNF-α, IL-12,

IL-18, INF- $\alpha/\beta$ ) y 4) Citocinas que regulan negativamente a los macrófagos (IL-10, TGF- $\beta$ ).<sup>4</sup>

#### **4.2 RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO EN LEUCOCITOS**

Para iniciar una respuesta inmunológica el primer paso en el trabajo de las células del sistema inmune es el reconocimiento del patógeno, esto es posible por la presencia de receptores en la superficie de estas células que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como lo son: los receptores tipo Toll (TLRs), Dectina-1, receptores de manosa, entre otros. También participan otros receptores que reconocen a los patógenos después de que estos son cubiertos por factores solubles encontrados en el suero que sirven como opsoninas, ejemplo de estos receptores son los receptores para complemento (CR1, CR2, CR3), los receptores para la fracción Fc (FcR) de los anticuerpos, o las integrinas.<sup>27</sup> Otros receptores involucrados en el reconocimiento del antígeno, ya en una etapa posterior y que son parte de la respuesta inmune adaptativa, son los receptores para antígeno de células B (BCR) y los receptores de células T (TCR).<sup>28</sup>

Tras el reconocimiento del patógeno por las células del sistema inmune se genera una variedad de respuestas que dependen del receptor y del tipo de célula que se active; se pueden identificar tres tipos de respuestas: 1. Permitir o mediar la internalización del microbio por las células fagocíticas, 2. Activar mecanismos antimicrobianos como la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y 3. Estimular la producción de citocinas inflamatorias y quimiocinas para reclutar y activar a otras células, e iniciar una respuesta adaptativa.<sup>27</sup> Estas respuestas deben estar reguladas para evitar el desarrollo de una inflamación sistémica patológica o un problema de autoinmunidad.

##### **4.2.1 Receptores de la fracción constante de inmunoglobulinas G (Fc $\gamma$ Rs)**

Dentro de este trabajo son de nuestro interés los receptores que reconocen la fracción constante de las inmunoglobulinas del isotipo G (Fc $\gamma$ Rs). Las inmunoglobulinas del isotipo G son las más abundantes en el suero y tienen un mayor tiempo de vida media, pueden interactuar a través de su fracción Fc con

varios tipos celulares; al participar como opsoninas serán reconocidos por receptores de membrana e inducir fagocitosis.<sup>28</sup>

Los receptores leucocitarios para el dominio constante (Fc) de las IgGs son miembros de la superfamilia de las Ig. Tres clases han sido descritas en humanos: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) (Figura 2). Los FcγRs están codificados por al menos 8 genes en el cromosoma 1, e isoformas adicionales pueden ser generadas por splicing alternativo. Contienen regiones extracelulares conservadas, pero sus regiones citoplasmáticas difieren entre si lo cual les brinda diferentes propiedades funcionales.

Los receptores para la región contante de las IgG participan de forma importante en la interacción entre la inmunidad humoral y celular.<sup>32</sup> A través de ellos, que son producto de la respuesta inmune adaptativa, los anticuerpos pueden mediar un amplio rango de funciones efectoras por distintos leucocitos.<sup>32</sup>

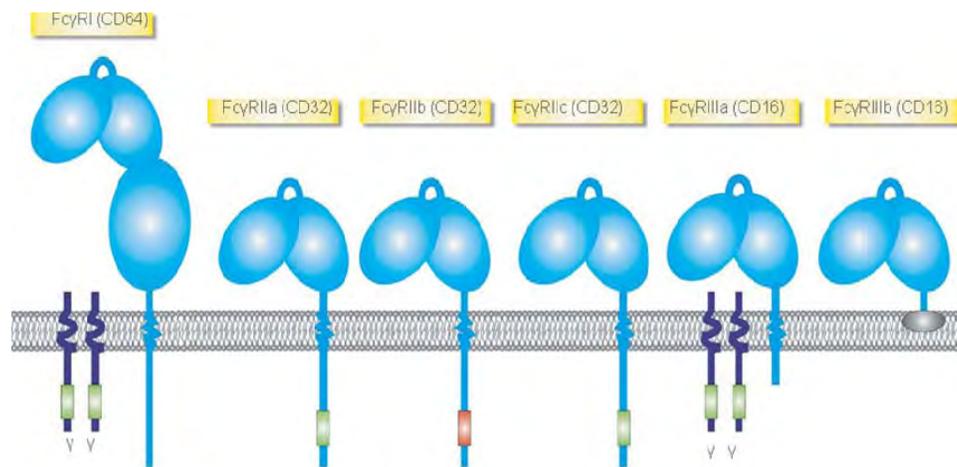


Figura 2. Representación esquemática de las diferentes clases de FcγRs.<sup>29</sup> La región extracelular (que une a las IgG) está formada por dos o tres dominios de inmunoglobulina. La capacidad de transducción de señales es mediada por los motivos ITAM. En el FcγRI y FcγRIIIa, los motivos ITAM se encuentran en las subunidades y asociadas al receptor. En el caso de FcγRIIa y IIC su propia región citoplásmica contiene los motivos ITAM, mientras que el IIB contiene un motivo ITIM inhibitorio. El FcγRIIIb no contiene región citoplásmica.

#### 4.2.1.1 FcγRI (CD64)

Está constituido por una región extracelular con tres dominios de inmunoglobulinas, un domino transmembranal y una cola citoplasmática. Es considerado como un receptor de alta afinidad para la IgG monomérica, la afinidad

de este receptor para las diferentes subclases de IgG varia de la siguiente forma: IgG3 > IgG1 > IgG4. El Fc $\gamma$ RI existe como un complejo hetero-oligomérico con cadena  $\alpha$  que se une al ligando y un homodímero de subunidades FcR  $\gamma$ .

Para entender el mecanismo por el cual algunos receptores Fc $\gamma$ R son mediadores de fagocitosis, Indik y colaboradores realizaron un estudio con células COS-1 (células no fagocíticas) las cuales fueron transfectadas con Fc $\gamma$ RI. Al estar ausente la subunidad  $\gamma$  las células no fueron capaces de fagocitar, lo que demostró que esta subunidad es esencial para inducir fagocitosis, debido a que en ella están presentes los motivos de activación basados en tirosinas (ITAM).<sup>29</sup> La cadena  $\gamma$  también participa en la estabilización del receptor en la superficie, en la señalización y en la afinidad de unión a su ligando. Los fagocitos profesionales expresan constitutivamente Fc $\gamma$ RI y la subunidad  $\gamma$ . El Fc $\gamma$ RI es un receptor altamente expresado en monocitos, macrófagos y en algunas poblaciones de células dendríticas.

Las funciones de este receptor en las células que lo expresan son diversas: internalización del antígeno, generación de superóxido, citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC), fagocitosis y producción de citocinas (Tabla 1).

#### 4.2.1.2 Fc $\gamma$ RII (CD32)

Se han identificado tres genes que codifican receptores del clase II: Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB y Fc $\gamma$ RIIC. Estructuralmente, los Fc $\gamma$ RIIs son moléculas con regiones extracelulares y transmembranales muy conservadas, pero la región citoplasmática difiere entre las tres isoformas. Este receptor no requiere de subunidades accesorias, ya que en su región citoplásmica contiene en el caso de los receptores activadores los motivos ITAM (Fc $\gamma$ RIIa y Fc $\gamma$ RIIc), o en el caso del receptor con actividad inhibitoria un motivo inhibitorio basado en tirosinas (ITIM) (Fc $\gamma$ RIIb). El entrecruzamiento de receptores resulta en la fosforilación de las tirosinas del ITAM de la cadena  $\alpha$ . También se ha demostrado que puede asociarse a la subunidad  $\gamma$  en aquellas células que la expresen.

Siendo receptores de baja afinidad sólo pueden interactuar con complejos inmunes o IgG agregadas. Es el receptor que se expresa en el mayor número de tipo celulares y no sólo en fagocitos profesionales; entre las células que expresan este receptor están los eosinófilos, basófilos, plaquetas, células endoteliales

placentarias y algunas subpoblaciones de linfocitos T. Las funciones con las que colabora en la respuesta inmune, los receptores de la subclase activadora son similares en las que participa el receptor FcγRI: producción de citocinas, internalización, fagocitosis, citotoxicidad mediada por anticuerpo, estallido respiratorio, etcétera. Mientras que la subclase inhibitoria colabora de diferente forma como lo menciona la Tabla 1.

#### **4.2.1.3 FcγRIII (CD16)**

Este receptor tiene dos isoformas que son codificadas por dos genes FcγRIIIA y FcγRIIIB. El FcγRIIIa tiene dos dominios de inmunoglobulina extracelulares y una cola citoplásmica, es considerado un receptor de afinidad media para las IgG. La expresión y función de este receptor depende de su asociación con la subunidad γ en monocitos y macrófagos, y con la subunidad ζ en células asesinas naturales (NK). La subclase FcγRIIIb exhibe baja afinidad para IgG y se expresa exclusivamente en PMNs. Las funciones mediadas por las dos subclases de receptores se mencionan en la Tabla 1.

Tabla 1. Función y distribución de los receptores Fcγ. <sup>30</sup>

	Expresión	Función	CD	Ligandos
<b>FcγRI</b>	monocitos, macrófagos, células progenitoras mieloides DC34+, células dendríticas, eosinófilos	Internalización, presentación de antígeno, estallido respiratorio, ADCC, fagocitosis, producción de citosinas	CD64	IgG
<b>FcγRII</b>	IIa. Monocitos, macrófagos, PMN, eosinófilos, basófilos, plaquetas, células endoteliales placentarias, subpoblaciones de linfocitos T, células de Langerhans. IIb. Células B, basófilos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, células de Langerhans. IIc. Células NK	IIa. Internalización, ADCC, fagocitosis, producción de citocinas, estallido respiratorio IIb1/IIb2. regulación negativa de células B, mastocitos, macrófagos	CD32	IgG
<b>FcγRIII</b>	IIIa. Macrófagos, células NK, subpoblaciones de linfocitos T, células de Langerhans. IIIb. PMN	IIIa. estallido respiratorio, ADCC, fagocitosis, producción de citocinas, inducción de adhesión, apoptosis IIIb. Generación de superóxido	CD16	IgG, concanavalina A, <i>Escherichia coli</i>

La activación funcional de los FcγR es producto de la agregación del receptor por la unión de complejos antígeno-anticuerpo o partículas opsonizadas. Esto desencadena la traducción de señales de la cadena adaptadora que contiene un dominio citoplasmático con motivos ITAM, o en el caso de FcγRII del motivo ITAM en la región citoplasmica.<sup>35</sup>

Después del entrecruzamiento de los receptores, las vías de señalización por FcγRs inician con la fosforilación de las tirosinas de los motivos ITAM en las subunidades del receptor por cinasas de la familia Src. Las tirosinas fosforiladas median el reclutamiento y activación de cinasas de la familia Syk. La cinasa Syk a su vez media la activación de varios blancos, como: fosfoinositol 3-cinasa (PI3K) y fosfolipasa Cγ (PLCγ), la cual participa en el incremento del calcio intracelular que colabora en diversos eventos de señalización posteriores. Algunas vías

dependientes de calcio son las de RAS-RAF-MAPK (proteín-cinasas activadas por mitógenos) (Figura 3).<sup>41</sup>

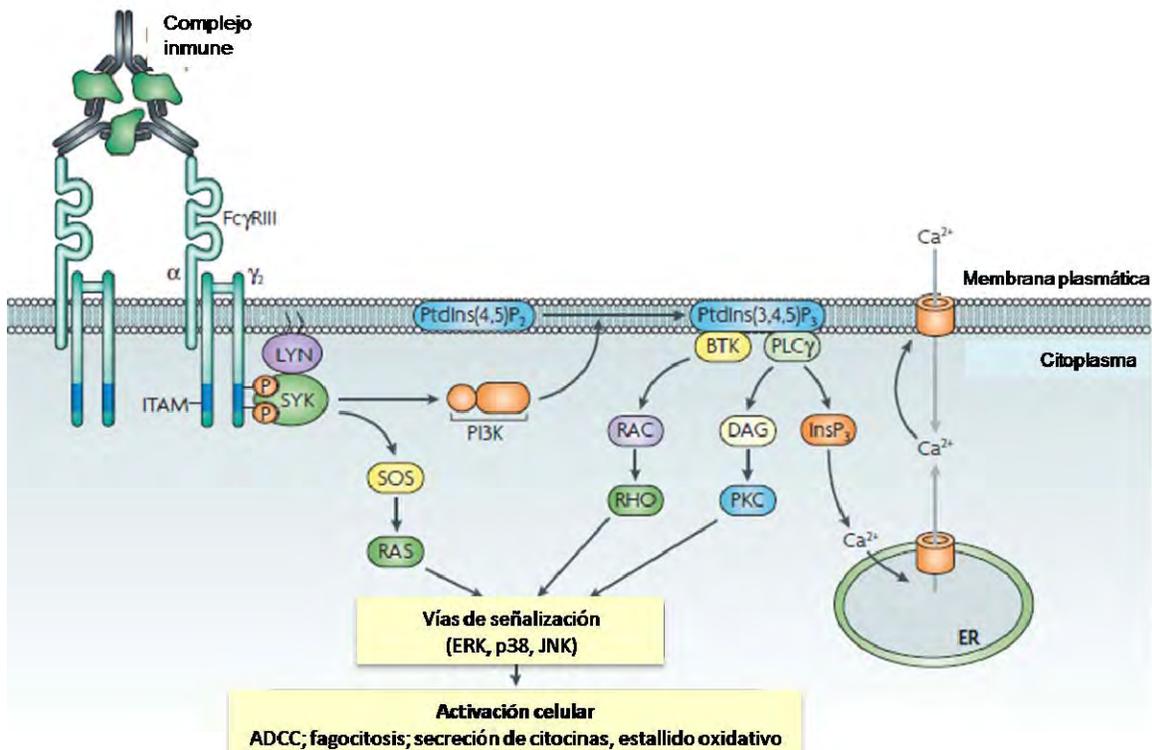


Figura 3. Vía de señalización de FcγRs y activación celular.<sup>35</sup>

Una de las principales funciones fisiológicas de los FcγRs es mediar la fagocitosis de partículas (bacterias, células senescentes, cuerpos extraños, etc.) recubiertas con anticuerpos de la clase IgG específicos para antígenos de la superficie de la partícula. Subsecuentemente a la fagocitosis en macrófagos existe un incremento en la formación de superóxido catalizado por la NADPH oxidasa.<sup>33</sup> Este proceso es denominado estallido respiratorio y está importantemente ligado a la fagocitosis, como veremos adelante. Algunos de los receptores que se han descrito como fagocíticos también pueden activar la NADPH oxidasa, ejemplos de estos se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 2. Receptores fagocíticos que promueven que la producción de ROS.

RECEPTORES FAGOCITICOS <sup>3</sup>	RECEPTORES QUE PRODUCEN ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO	Ref
<i>Familia de la proteína de lectinas tipo C</i>		
MMR	SI	51
DC-SING	SI	51
L-SING	No descrito	52
DEC-205	No descrito	
Endo-180	No descrito	
Langerina	No descrito	
DCAL-1	No descrito	
BDCA-2	No descrito	
Dectina-1	SI	
<i>Receptores Scavenger (basura)</i>		
SRA	SI	53
CD36	No descrito	
Lox1	No descrito	
MARCO	No descrito	
CD14	No descrito	
<i>Receptores para opsoninas</i>		
<i>Receptores para complemento</i>		
CR1	SI	52
CR3	NO	52
CR4	NO	52
<i>Receptores para la fracción Fc de las Ig</i>		
FcγRI	SI	30
FcγRIIa	SI	30
FcγRIII	SI	30

### 4.3 ESTALLIDO RESPIRATORIO

El oxígeno es un elemento de vital importancia para la vida de cualquier tipo celular y es utilizado en varios procesos metabólicos como aceptor de electrones. En el siglo pasado, Baldrige y Gerard observaron que los leucocitos que se encontraban en fagocitosis activa aumentaban considerablemente su consumo de oxígeno, a lo que dieron el nombre de estallido respiratorio.<sup>8</sup>

Durante varios años se continuaron realizando investigaciones que ponían en evidencia que la fagocitosis de bacterias por leucocitos era acompañada por un estallido respiratorio no mitocondrial, que no era requerido para la fagocitosis pero

que participaba en la muerte de algunas bacterias.<sup>9</sup> Posteriormente se identificó que los fagocitos profesionales (neutrófilos y macrófagos, incluso células dendríticas) tenían la habilidad de convertir el oxígeno molecular en superóxido, explicando así el alto consumo de oxígeno que se observaba durante la fagocitosis de bacterias.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS: reactive oxygen species) son moléculas derivadas del oxígeno molecular y que tienen propiedades redox; dentro de estas se encuentran los radicales libres como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), el radical hidroperoxilo ( $\cdot OH_2$ ), el radical peroxil ( $\cdot OOR$ ) y el radical alcoxy ( $\cdot OR$ ), además de moléculas no radicales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).<sup>18</sup> Estas moléculas son parte importante de la capacidad microbicida dependiente de oxígeno en neutrófilos y macrófagos, y actúan junto con las proteasas y otras enzimas hidrolíticas en la muerte de bacterias dentro del fagolisosoma. Actualmente se define al estallido respiratorio como la producción de ROS en un proceso mediado por un receptor.<sup>10</sup>

La producción de superóxido a partir de oxígeno molecular, es un proceso enzimático llevado a cabo por la NADPH oxidasa. Durante la fagocitosis a través de distintos receptores (Tabla 2), la NADPH oxidasa se activa para reducir oxígeno molecular a anión superóxido, reacción acoplada con la oxidación de NADPH. La generación de ROS es un mecanismo microbicida esencial para la inmunidad.<sup>14</sup> La NADPH oxidasa es una enzima multimérica que contiene componentes unidos a membranas (flavocitocromo *b558*: *gp92phox* y *p22phox*), así como componentes reguladores citoplasmáticos (*p67phox*, *p47phox*, *p40phox* y *Rac1/2* (GTP-asa)).<sup>12</sup> En células en reposo la NADPH oxidasa se encuentra desensamblada e inactiva. Tras algún tipo de estímulo, la NADPH oxidasa se ensambla en la membrana y puede catalizar la reducción de oxígeno molecular. La localización y participación de cada subunidad en el ensamble de la NADPH oxidasa se muestra en la Figura 4.

Debido a la alta reactividad y la baja selectividad de los ROS, la NADPH oxidasa es activada sobre la membrana del fagosoma y el superóxido generado es liberado hacia el interior del fagosoma, lo que previene el daño a las células

adyacentes.<sup>33</sup> Una desregulación o una inapropiada activación de la NADPH oxidasa trae como resultado muerte celular e inflamación del tejido.<sup>34</sup>

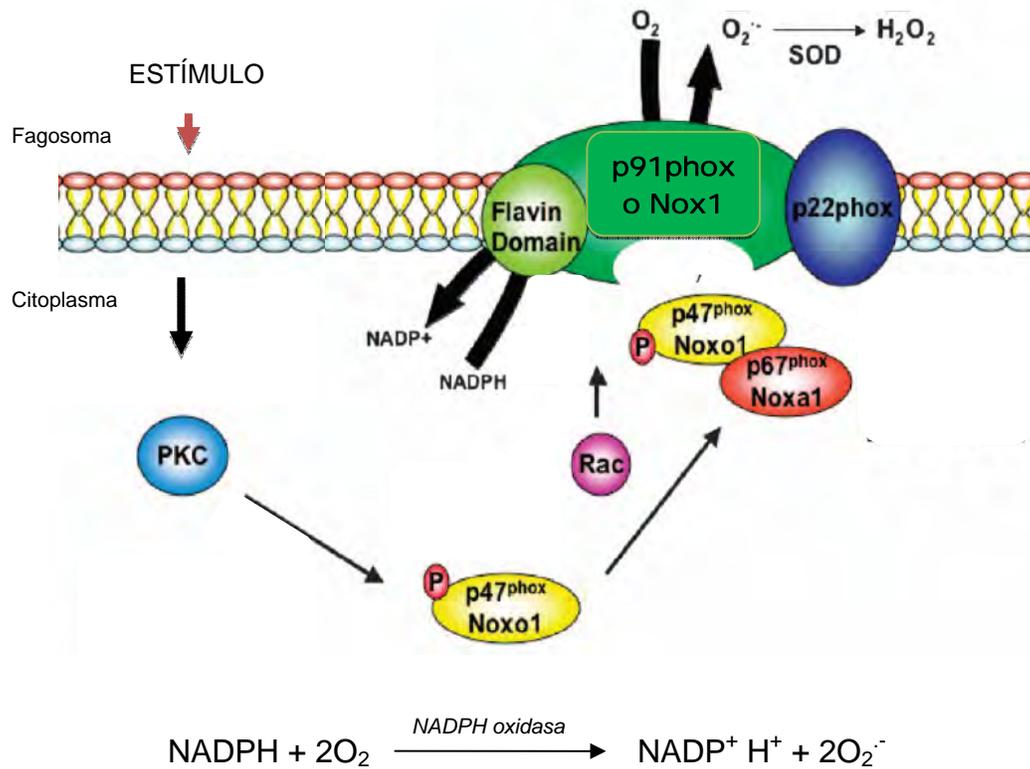


Figura 4. NADPH oxidasa. Subunidades y localización.<sup>13</sup>

El estallido respiratorio contribuye a la alta capacidad microbicida de neutrófilos y macrófagos<sup>8,9,14</sup>. Los neutrófilos como primera línea de defensa eliminan a los microorganismos por fagocitosis y secretan quimiocinas que reclutan a otros tipos celulares como macrófagos, que colaboraran en la eliminación del microorganismo y en la reparación del tejido. Los fagocitos profesionales expresan constitutivamente a la NADPH oxidasa, la cual es activada por un amplio número de receptores incluyendo los de tipo fagocítico y receptores para moléculas quimioatrayentes o para “moléculas de peligro” (Tabla 2).<sup>45</sup>

La activación de la NADPH oxidasa en células fagocíticas requiere de la fosforilación de varias de sus subunidades. Las subunidades p22-*phox* y p91-*phox* son dos proteínas integrales de membrana que forman el sitio catalítico de la

NADPH oxidasa, conocido como el citocromo b558. El citocromo b558 participa en la transferencia de electrones entre el NADPH y O<sub>2</sub> para la producción de superóxido, cuando la enzima está completamente ensamblada.

La estimulación de la célula induce la fosforilación de la subunidad p47*phox*. La fosforilación de esta subunidad induce a su vez, un cambio conformacional en sus dominios SH3 y PX, lo cual deja accesibles los sitios de unión a sus blancos en membrana, p22*phox* y lípidos de fosfoinositol. La p67*phox* está constitutivamente asociada a p47*phox* vía la interacción del dominio SH3 C-terminal. La asociación de p67*phox* con p47*phox* permite su translocación a la membrana.<sup>36</sup>

Por otra parte, la GTPasa Rac es reclutada independiente de otras subunidades; cuando Rac se activa interactúa con p67*phox* vía su extremo N-terminal al dominio TPR de p67*phox*. El complejo Rac-p67*phox* parece tener como blanco p91*phox*, subunidad del sitio catalítico de la enzima que permite la producción de superóxido.<sup>36</sup> Así, Rac participa en la fagocitosis mediada por FcγR en al menos dos procesos: la activación de la NADPH oxidasa y el re-arreglo del citoesqueleto de actina.<sup>33</sup>

Un factor adicional involucrado en el ensamble de la enzima es la subunidad p40*phox*, que parece participar como una molécula que estabiliza el complejo formado en membrana por las subunidades antes mencionadas; su translocación a membrana es independiente de p47-*phox* y p67*phox*.<sup>43</sup>

Con base al estudio de la participación de cinasas activas en la inducción del estallido respiratorio mediante el estímulo con zimosán y PMA, se sugiere que p38 MAPK y PI3K participan en las vías de la fagocitosis y del estallido respiratorio, mientras que PKC sólo participa en la producción de superóxido.<sup>33</sup>

La importancia del estallido respiratorio para combatir infecciones adecuadamente es demostrada por las infecciones recurrentes observadas en individuos con enfermedad granulomatosa crónica (CGD). La CGD es una inmunodeficiencia hereditaria causada por defectos en la NADPH oxidasa. En pacientes con esta enfermedad se han reportado una gran variedad de mutaciones en genes que codifican para las subunidades gp91-, p22-, p67- y p47-*phox*.<sup>14</sup> La enfermedad se caracteriza por infecciones recurrentes como enteritis,

infecciones en la piel, abscesos hepáticos o pulmonares; dependiendo de la gravedad pueden existir osteomielitis y septicemias. En la CGD, la capacidad microbicida dependiente de ROS en las células fagocíticas se ve disminuida o anulada, afectando un importante proceso de la respuesta inmune innata.

La presencia de las especies reactivas de oxígeno en altas concentraciones producto de la actividad de la NADPH oxidasa en células fagocíticas (células dendríticas y macrófagos), parece participar no sólo en la eliminación del patógeno, sino que también podrían estar implicadas en el control de algunas vías de señalización, actuando como segundos mensajeros, mediadores de apoptosis y reguladores de la expresión de genes por su acción sobre factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1.<sup>46</sup> En M $\Phi$ s, las ROS han demostrado participar alterando o regulando moléculas que participan en vías de señalización como PTP, ERKs, JNKs y p38 MAP cinasas, y se ha observado que algunos estímulos que inducen la activación de ERKs, activaban la NADPH oxidasa,<sup>47</sup> induciendo el estallido respiratorio.<sup>10</sup>

#### **4.3.1 Métodos de detección de especies reactivas de oxígeno**

La capacidad de cuantificar la formación de especies reactivas de oxígeno en diferentes tipos celulares es de gran importancia en diversas ramas de la investigación debido a la participación de estas especies en procesos biológicos como el estrés oxidativo y la hipertensión arterial, entre otros. Por otro lado el diagnóstico de la CGD se hace analizando la capacidad de producción de especies ROS por leucocitos. Esto ha llevado a la búsqueda de métodos de cuantificación que permitan realizar un análisis cuantitativo confiable y de mayor sensibilidad.



El fundamento básico de una sonda o colorante para medir especies reactivas de oxígeno es la susceptibilidad a la oxidación. Todas las especies generadas a partir del radical superóxido presentan un fuerte poder oxidante, evaluado mediante la comparación de potenciales con relación al electrodo de hidrogeno (electrodo de referencia).<sup>15</sup> El cambio de la configuración electrónica de la sonda, producto de la reacción de óxido-reducción que se lleva a cabo entre la sonda y las especies reactivas, modifica algunas propiedades del colorante, que al perder electrones puede mostrar un cambio de color o adquirir propiedades de fluorescencia o luminiscencia.

Los métodos espectrofotométricos más utilizados son los llamados métodos de captura, que utilizan un compuesto orgánico típicamente nitroso, relativamente estable que captura electrones de las ROS con los que interactúa, el resultado de esta reacción son aductos que pueden ser detectados por espectrofotometría. Un ejemplo típico de estos compuestos es el Nitroazul de Tetrazolio (NBT). El superóxido tiene una propiedad ambivalente de reducir u oxidar, en el caso del NBT, al ser reducido por los ROS genera un radical univalente de NBT, la dismutación de dos radicales de NBT forman un producto final llamado formazán (Figura 6). El formazán es un compuesto insoluble, que tiene la ventaja de poder ser localizado en un tejido, sin embargo, su insolubilidad a la vez es su principal inconveniente para la cuantificación por métodos colorimétricos. Otra desventaja de este tipo de colorantes es una escasa sensibilidad en comparación con otras sondas.<sup>17</sup> Igual que la utilización del NBT, la reducción del citocromo c (Cyt c) fue uno de los métodos espectrofotométricos más popularmente utilizados para medir especies reactivas de oxígeno en diversos sistemas, esto colaboraba importantemente en la inespecificidad del ensayo.

Con el interés de modificar la sensibilidad y especificidad de los ensayos se desarrollaron otros tipos de sondas que utilizaban la cuantificación de quimioluminiscencia o fluorescencia.

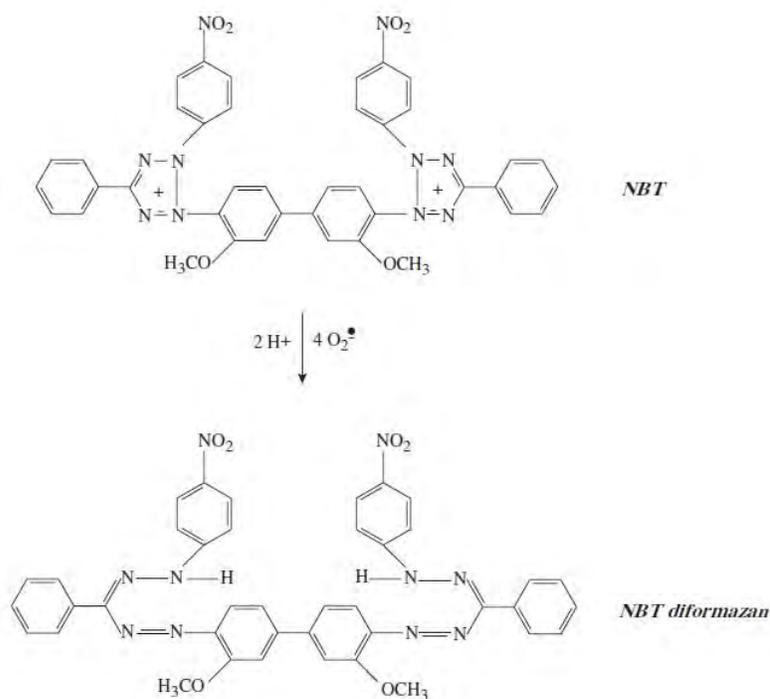


Figura 6. NBT utilizado para la detección de superóxido.<sup>17</sup>

Reactivos como el luminol requieren de la presencia de una peroxidasa para llevar a cabo la conversión del colorante a su forma detectable (como la peroxidasa de rábano). El luminol ha sido utilizado para cuantificar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en varios tipos celulares y diversas condiciones de estudio por su versatilidad, además, su uso se vio incrementado por su ventaja de poder internalizarse en la célula.<sup>19</sup> En presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la peroxidasa transfiere un electrón para oxidar al luminol produciendo un radical luminol, el cual subsecuentemente reacciona con un radical luminol adicional y lleva a la generación de un endoperóxido inestable, que finalmente genera un compuesto llamado aminoftalato (Figura 7).<sup>17</sup> Estos compuestos derivados de la reacción del luminol generan quimioluminiscencia. Sin embargo, el luminol puede reaccionar con diversas ROS, lo que disminuye la capacidad del ensayo para discriminar entre las diversas especies presentes.<sup>15</sup>

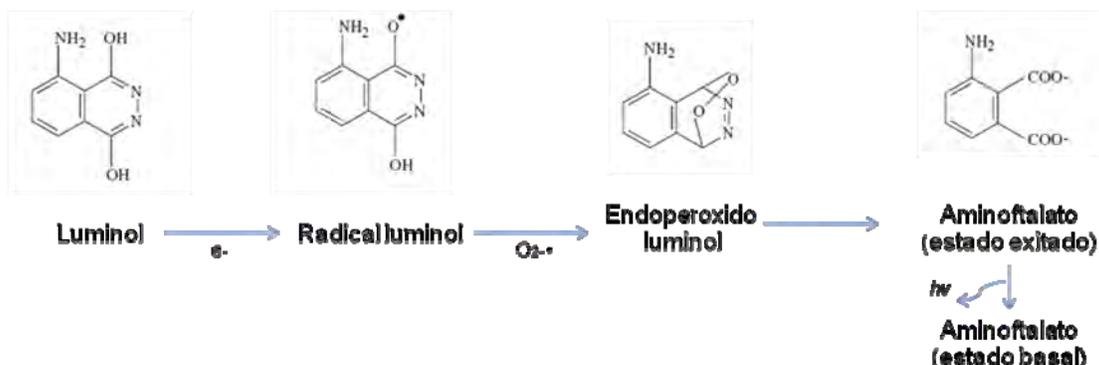


Figura 7. Vía de reacción del luminol.<sup>17</sup>

Otros métodos frecuentemente utilizados son aquellos basados en la cuantificación de productos fluorescentes, especialmente los llamados “fluoroforos positivos”;<sup>17</sup> estos compuestos son moléculas no fluorescentes (o de baja fluorescencia) que al reaccionar con las ROS producen un nuevo compuesto capaz de emitir fluorescencia. Las técnicas de cuantificación que utilizan este tipo de colorantes presentan mayor versatilidad, sensibilidad y muestran una amplia linealidad a varias concentraciones de ROS; contribuye a su utilidad el hecho de que estos compuestos pueden ser cuantificados por fluorimetría, citometría u observados en microscopio de fluorescencia.<sup>15</sup>

Uno de los compuestos más utilizados es la diclorodihidrofluoresceína ( $H_2DCF$ ), la cual fue utilizada inicialmente como un compuesto capaz de cuantificar “ultramicro” cantidades de hidroxiperóxidos (como peróxido de hidrogeno y lípidos hidropoxidados)<sup>17</sup>. Una desventaja del  $H_2DCF$  radica en que puede tener reacciones secundarias, como la descomposición del colorante por la exposición a luz (Figura 9). Este problema se ha podido evitar al generar la forma diacetilada ( $H_2DCF-DA$ ) de este colorante, que muestra una mayor estabilidad. Esta forma diacetilada también presenta una mayor facilidad para atravesar la membrana celular, estando dentro de la célula es susceptible a esterasas, regresa a la forma de  $H_2DCF$  la cual en presencia de hidroxiperóxidos es oxidado, y se convierte en un compuesto fluorescente (DCF).<sup>15,17</sup> (Figura 9)

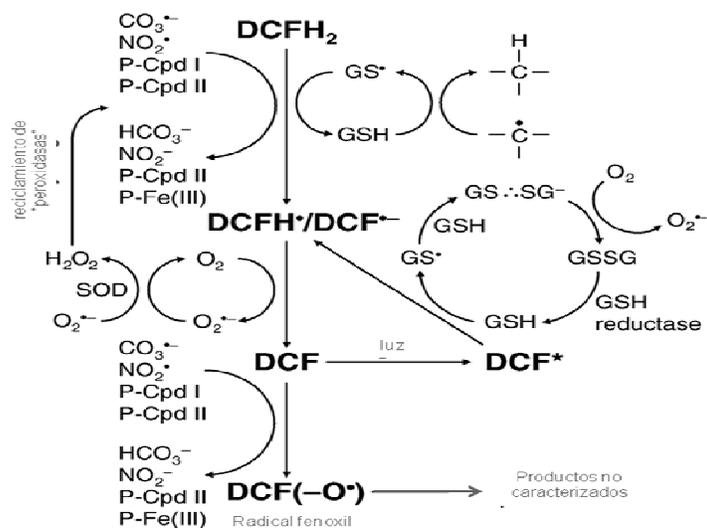


Figura 8. Posibles vías de reacción en la cuales pueden estar involucradas colorantes con dihidrofluoresceína.<sup>15</sup> Modificado de Wardman, P.

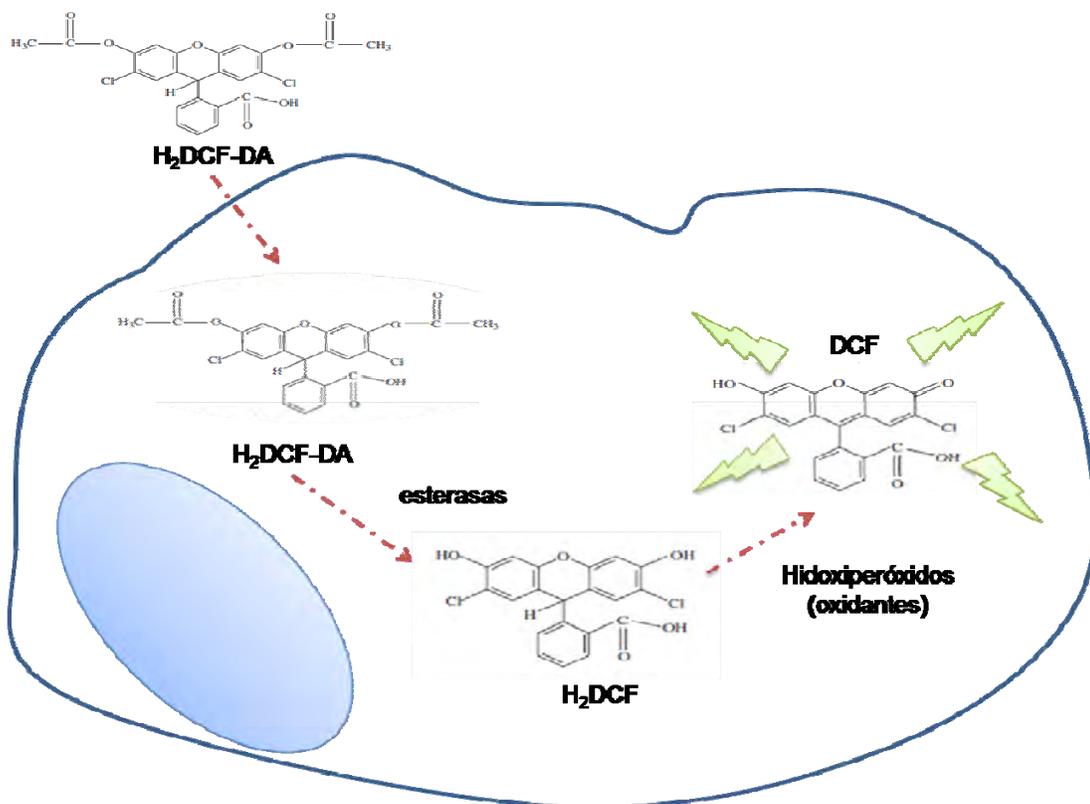


Figura 9. Mecanismo de detección del H<sub>2</sub>DCF-DA.<sup>15,17</sup>

Existen numerosos reportes del uso del H<sub>2</sub>DCF-DA o de su forma no acetilada (H<sub>2</sub>DCF) para medir oxidantes intracelulares, usando citometría de flujo<sup>20,22-25</sup> o fluorimetría<sup>21,26</sup>. En estos reportes se ha observado el estallido respiratorio en neutrófilos y fagocitos mononucleares, inducido por varios

estímulos, como complejos inmunes de IgGs, PMA, zimosán, o por la fagocitosis de bacterias.

#### **4.4 AMINOPEPTIDASA N (CD13)**

CD13, también denominada *Aminopeptidasa N* (APN), es una molécula expresada en la membrana de una amplia variedad de tipos celulares, como en epitelio renal e intestinal, en el sistema nervioso, en células del linaje mieloide (monocitos, macrófagos y DC), fibroblastos y células endoteliales.<sup>37</sup> Es una ectoenzima (E.C.3.4.11.2) altamente glicosilada que pesa aproximadamente 160kDa, codificada en el cromosoma 15 (q25-q28), y miembro de la familia de las metaloproteasas dependientes de zinc.<sup>36</sup>

CD13 ha sido una molécula muy estudiada por presentar una amplia gama de funciones que incluyen la actividad enzimática, su papel como receptor viral y capacidad de transducción de señales. CD13 además es considerado un marcador del linaje mieloide en células normales y en anormales como leucemias; debido a que es altamente expresada durante los primeros estadios de diferenciación.

##### **4.4.1 Actividad enzimática**

CD13 es capaz de remover aminoácidos N-terminales preferentemente de naturaleza neutra, regulando así la actividad de diversos péptidos que incluyen: encefalinas, angiotensinas, citocinas y quimiocinas, componentes de matriz extracelular y otros. En cáncer la sobreexpresión de CD13 podría colaborar con la invasividad de las células cancerosas. Debido a que parece ayudar al procesamiento de algunos factores de crecimiento (TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10) se le relaciona con la diferenciación celular de algunos linajes hematopoyéticos; sin embargo, recientemente se demostró que CD13 no es indispensable para la una hematopoyesis normal.<sup>48</sup>

CD13 se ha asociado con la motilidad de células metastásicas y de espermatozoides, debido a su participación en el procesamiento de péptidos de matriz extracelular, y de encefalinas seminales, respectivamente. Participa en la angiogénesis degradando proteínas de la matriz extracelular, degradando péptidos con propiedades angiogénicas y no angiogénicas, y modulando la señalización de

factores angiogénicos y de crecimiento. Con relación a su participación en la respuesta inmune adaptativa, parece colaborar *in vivo* con la quimiotaxis de linfocitos T en algunas patologías pulmonares; en células dendríticas se ha reportado que colabora con el procesamiento extracelular de algunos péptidos que se presentan en contexto del MHC-II.

#### 4.4.2 Endocitosis

CD13 participa como receptor de algunos virus, como Coronavirus 229E (HCoV-229E) y algunos otros coronavirus enteropatogénicos, además de participar en los eventos tempranos de la infección por citomegalovirus (HCMV) y asociándose a las partículas virales durante su maduración. Parece también participar en la internalización del colesterol y su cristalización.<sup>39</sup>

#### 4.4.3 Participación como molécula transductora de señales

Estructuralmente, CD13 contiene siete dominios, en el dominio C-terminal ubicado en la cara extracelular se encuentra el sitio catalítico de la aminopetidasa. Contiene una cola citoplásmica N-terminal muy corta, de aproximadamente ocho residuos de aminoácidos, y no se le ha asociado ningún motivo de transducción de señales, por lo cual se sugiere debe asociarse a una proteína auxiliar para llevar a cabo estas funciones.

El entrecruzamiento de CD13 con anticuerpos anti-CD13, genera agregación homotípica de células U937 y monocitos aislados de sangre periférica, lo cual puede ser abrogada con la presencia de galectina-3, posible ligando de CD13; esta agregación es dependiente de la señalización por CD13 e independiente de su actividad enzimática.

#### 4.4.4 Fagocitosis por CD13

En 1989 McIntyre<sup>40</sup> y colaboradores utilizando diferentes isotipos de anticuerpos anti-CD13 para estimular células U937, observaron que el entrecruzamiento de CD13 inducía el incremento en la movilización de calcio, lo cual podría ser resultado de la formación de complejos en la membrana celular entre CD13 y los receptores para la fracción constante de las inmunoglobulinas FcγRI y RII. Esto indicó que el entrecruzamiento de CD13 puede llevar a la activación de cascadas de señalización en conjunto con los FcγRs.

Posteriormente se demostró por microscopia confocal<sup>41</sup>, microscopia electrónica y FRET<sup>42</sup> que CD13 y FcγRI y RII se co-localizaban espacialmente<sup>41,42</sup> y podrían estar asociados.<sup>42</sup>

Aunado a la movilización de calcio que se había demostrado estimulando con anticuerpos anti-CD13 a células monocíticas, se observó que induce la activación de la cascada de las MAP cinasas, y el incremento del mRNA para IL-8,<sup>49</sup> y la co-localización de CD13 con los receptores Fcγ.

Tokuda y Levy<sup>43</sup> realizaron un ensayo donde indujeron la fagocitosis de perlas fluorescentes en monocitos aislados de sangre periférica y observaron que aquellas células que expresaban mayor cantidad de CD13 eran las células con mayor número de perlas fagocitadas, al diferenciar estas células con vitamina D<sub>3</sub>, estas características se seguían conservando, y correlacionaron a la expresión CD13 con una mayor capacidad fagocítica.

Con base a lo anterior, en este laboratorio se evaluó la participación de CD13 en la fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados a través de FcγRs. Se observó que CD13 es capaz de incrementar hasta en un 220% la fagocitosis mediada por FcγRI, comparándola con la fagocitosis observada solo vía el FcγRI.<sup>41</sup> Se observó también, que CD13 y los FcγRs co-localizaban en el fagosoma; y que la fosforilación de Syk así como la duración de la fosforilación de se vieron incrementadas cuando se entrecruzaban al mismo tiempo CD13 y FcγRs. Estos resultados, junto con los reportados por Tokuda y Levy, sugieren que CD13 puede estar participando aumentando la fagocitosis por FcγRs.<sup>41</sup>

Debido a que CD13 parece estar implicado en una amplia variedad de procesos, se le considera como un blanco terapéutico en algunos tipos de leucemias. Recientemente CD13 se propuso como un blanco terapéutico en cáncer de hígado por células troncales (stem cell). Se observó que CD13 se expresaba en mayor proporción en células consideradas stem cell en líneas celulares de cáncer en hígado (de origen viral y no viral), y se correlaciono la expresión de CD13 con la resistencia al tratamiento por quimio y radioterapia. Se demostró que al tratar estas líneas celulares con algunos anticuerpos monoclonales contra CD13 se generaban más especies reactivas de oxígeno en

el interior de la célula posterior al tratamiento, lo cual llevaba a estas células a la apoptosis.<sup>44</sup>

Por sus implicaciones en angiogénesis, quimiotaxis, fagocitosis y otros procesos celulares, CD13 representa una molécula de interés en estados patológicos, como infección o cáncer, por lo cual es de importancia seguir caracterizando otro tipo de funciones mediadas por este receptor. Aunque existen trabajos que mencionan la participación de CD13 en la producción de especies reactivas de oxígeno, y se ha demostrado que CD13 puede inducir fagocitosis, no hay reportes que indiquen su participación como un receptor que induce estallido respiratorio. Este trabajo colaboraría con la caracterización de CD13 como receptor fagocítico.

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

CD13 es un receptor de membrana capaz de mediar diferentes funciones en células del linaje mieloide como monocitos y macrófagos, tales como la fagocitosis. El incremento de la fagocitosis por FcγRI, en un proceso que también aumenta la fosforilación de Syk. Por lo tanto, es de interés determinar si CD13 es capaz de llevar a cabo otras funciones efectoras de los macrófagos.

## 6. HIPÓTESIS

La estimulación a través de CD13 es capaz de inducir el estallido respiratorio en macrófagos y de modular el estallido respiratorio inducido a través de FcγRI y FcγRII.

## 7. OBJETIVOS

- Determinar si la estimulación a través de CD13, es capaz de inducir el estallido respiratorio en macrófagos durante la fagocitosis de partículas.
- Determinar si hay una asociación funcional entre FcγR y CD13, en la inducción del estallido respiratorio en macrófagos durante la fagocitosis de partículas.

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1 *Obtención de monocitos humanos de sangre periférica*

Las células mononucleares de sangre periférica fueron aisladas por centrifugación en gradiente de densidad a partir de concentrados leucocitarios (buffy coats) de donadores sanos obtenidos del Banco de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Cincuenta mililitros de concentrado leucocitario se depositaron en tubos de polipropileno de 50mL (Falcon) y se centrifugaron a 1653 rpm por 30´a 20°C (Eppendorf centrifuge 5810R); se separó el suero autólogo del paquete celular (eritrocitos y leucocitos).

El suero autólogo colectado (15mL) se inactivó por calor durante 30 minutos a 56°C, posteriormente se centrifugó 40´a 4600 rpm a 4°C (Sorvall Legend March 1.6R), se decantó el sobrenadante en un tubo nuevo y se centrifugó 40´a 4600 rpm. Después de la segunda centrifugación, el suero se filtró con un filtro pirinola de 0.22µm. El suero filtrado se agregó a cajas Petri de plástico estériles por al menos media hora. Para cajas Petri de 150mm X 25mm (Corning) se adicionó 5mL y a cajas de 60mmX15mm (Corning) 2.5mL. Estas cajas fueron posteriormente usadas para cultivar los monocitos autólogos.

Por otro lado, el paquete de células se resuspendió en un volumen de PBS (amortiguador salino de fosfatos, pH 7.4) igual a dos veces el volumen original del concentrado leucocitario. En un tubo Falcon de 50mL se adicionaron 15mL de Ficoll-Paque (Amersham). Sobre la capa de Ficoll se adicionaron de 25-30mL de la suspensión 1:2 de sangre completa. Se centrifugó a 2300 rpm a 18-20°C por 30´ (Sorvall Legend March 1.6R). Después de la centrifugación se retiró la capa superior, y se colectó la interfase (células mononucleares) en PBS frío (Figura 10). Se realizaron 3 lavados de las células de la interfase con PBS 1X frío a 1400 rpm durante 10´a 4°C. Los eritrocitos presentes en el botón celular se lisaron con una solución de lisis (NH<sub>4</sub>Cl, NaHCO<sub>3</sub>, EDTA) durante 3 minutos en hielo, con agitación constantemente, transcurrido este tiempo se adicionaron 50 ml de PBS 1X frío. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS frío centrifugando a 1400 rpm, 5´a 4°C.

Las células obtenidas se resuspendieron en RPMI-1640 (Gibco) complementado sin suero a 4°C, adicionado con 1 mM piruvato de sodio, 0.1 mM solución de aminoácidos no esenciales, 0.1 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, y 100 µg/ml estreptomina, se colocaron en cajas Petri de 150mm X 25mm (Corning) (15mL de la suspensión celular por caja) y en cajas de 60mmX15mm (Corning) (5mL de suspensión celular por caja), incubándolas 30´ a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al cabo de este tiempo las células no adherentes se eliminaron con 6 lavados con PBS a temperatura ambiente, siendo estos lavados de 5mL para las cajas grandes y 2mL para las cajas chicas. Finalmente se les adicionó 45mL de RPMI-1640 complementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) en las cajas de 150mm X 25mm (Corning) y 20mL en las cajas de 60mm X 15mm (Corning).

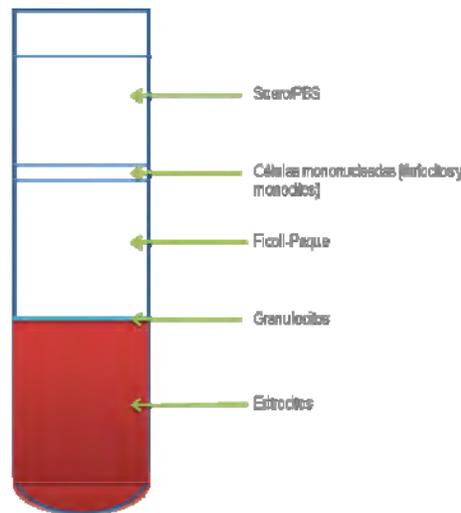


Figura 10. Perfil del gradiente de densidades después de la centrifugación del concentrado leucocitario con Ficoll-Paque (Amersham).

### **8.2 Diferenciación de monocitos a macrófagos**

Los monocitos se mantuvieron incubándolos a 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, al día 3 de haber sido aislados, se adicionaron al cultivo 10mL de medio fresco complementado con 5% de SFB. Los macrófagos derivados de monocitos se obtuvieron tras 6 días en medio RPMI-1640 (Gibco) al 5% de SFB.

### **8.3 Determinación de la pureza de macrófagos**

Los macrófagos son células adherentes, debido a esto se despegaron retirando el sobrenadante y agregando 5mL de PBS frío, colocando la caja sobre hielo por 5´. Posteriormente se despegaron las células con ayuda de un gendarme

(cell scraper, Falcon) colectándolos en tubos Falcon de 50mL para centrifugarlos a 1500 rpm por 3'. Se cuantifican las células en cámara de Neubauer, evaluando su viabilidad por la incorporación de azul tripano.

La pureza de las células se determinó por citometría de flujo por medio de inmunofluorescencia directa. Los macrófagos se marcaron con anticuerpo anti-CD14 humano acoplado a FITC (isocianato de fluoresceína) (Beckman Coulter).

### **8.3.1 Inmunofluorescencia directa**

Para la citometría de flujo se resuspendieron  $4 \times 10^5$  células en 300µL de amortiguador de lavados (PBS, SFB 5%, azida de sodio 0.01%) y se colocaron en tubos para FACS. Posteriormente se agregaron 10µL del anticuerpo anti-CD14-FITC y se incubó protegido de la luz en hielo por 30' con agitación ocasional.

Se lavó con amortiguador para lavados, centrifugando a 1400 rpm por 5' (Sorvall Legend March 1.6R) y se decantó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 300µL del amortiguador de lavados, esta operación se repitió dos veces más, el último lavado se realizó con PBS frío.

Las células se resuspendieron finalmente en 400µL de paraformaldehído (PFA/PBS) al 1% y se incubaron por 20 minutos en hielo cubierto de la luz. AL terminar la incubación se lavaron con PBS y se resuspendieron en 300µL de PBS.

El porcentaje de células positivas se evaluó en el citómetro de flujo (FACScan) como indicador del porcentaje de expresión.

### **8.4 Expresión de receptores en macrófagos diferenciados de monocitos**

Después de obtener macrófagos tras 6 días de cultivo con RPMI 1640 al 5% de SFB, se determinó la expresión de FcγRI, FcγRII y CD13 por inmunofluorescencia indirecta de las células que fueron utilizadas para el ensayo de ROS.

#### **8.4.1 Inmunofluorescencia indirecta**

Se resuspendieron  $4 \times 10^5$  células en 300µL de amortiguador de lavados (PBS, SFB 5%, Azida de sodio 0.01%) y se colocaron en tubos para FACS. Posteriormente se agregaron 10µg del anticuerpo anti-FcγRI (32.2), anti-FcγRII (IV-3) y anti-CD13 (452). Se incubó en hielo por 30' con agitación ocasional.

Se lavó con amortiguador de lavados, centrifugando a 1400 rpm por 5´ (Sorvall Legend March 1.6R) y se decantó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 300µL del amortiguador de lavados, esta operación se repitió dos veces más. Se agregó 300µL del segundo anticuerpo cabra anti-ratón FITC (Zymed 82-6511) en una dilución 1:400 en amortiguador de lavados. Las células con el segundo anticuerpo se incubaron 30´ en hielo, protegidas de la luz con agitación ocasional.

Se lavó 1 vez más con 300µL de amortiguador de lavados y 1 lavado más con PBS frío, se resuspendió en 400 µL de PFA/PBS 1% y se incubaron por 20 minutos en hielo, cubiertas de la luz. AL terminar la incubación se lavaron con PBS y se resuspendieron en 300µL de PBS.

Se leen en el clitómetro de flujo (FACScan) evaluando la media geométrica de fluorescencia como indicador de niveles de expresión de los receptores.

### **8.5 Sensibilización de eritrocitos con trinitrobenzen sulfonato (TNBS)**

Después de mantener los eritrocitos de carnero en solución de Alsevers, en esterilidad por una semana, se tomaron 2mL de eritrocitos y se lavaron con 5mL de DGVB (Amortiguador Veronal con 0.05% gelatina y 2.5% dextrosa) por 6´ a 3600 rpm. Se lavaron una vez más en 5mL de amortiguador de boratos (pH de 8.1) por 6´ a 3600 RPM. Después de retirar el sobrenadante, al pellet se le agregó 0.0124g de TNBS (Eastman Kodak Co.) disuelto en 5 mL de amortiguador de boratos, se incubó por 10´ a temperatura ambiente, protegido de la luz, con agitación contante. Al terminar esta incubación se adicionó inmediatamente 5mL de DGVB y 5mL de amortiguador de boratos, y se centrifugo 6´ a 3600 rpm, después de retirar este sobrenadante se lavaron los eritrocitos al menos 2 veces más para eliminar los eritrocitos lisados debido al tratamiento. Estos eritrocitos sensibilizados (GR-TNBS) se guardaron cubiertos de la luz a 4°C, lo cuales podían ser utilizados durante 1 semana después de ser preparados.

### **8.6 Hemaglutinación**

Para determinar la dilución de anticuerpo  $\alpha$ -DNP (policlonal de conejo) a ser utilizado para opsonizar los glóbulos rojos, se llevó a cabo una hemaglutinación donde se realizaron diluciones seriadas del anticuerpo y se

pusieron en contacto con los GR-TNBS incubándolos por 1 hora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. El título de hemaglutinación determinado se utilizó para opsonizar los glóbulos rojos de carnero, que se utilizan en los ensayos de fagocitosis a través de FcγRs.

### **8.7 Marcaje de eritrocitos de carnero con F(ab)<sub>2</sub> cabra anti ratón**

Los eritrocitos de carnero se mantuvieron en solución de Alsevers en esterilidad. Del fondo del frasco sin mezclar se tomaron 500μL de eritrocitos y se colocaron en 1mL de PBS con albumina sérica bovina (BSA) al 0.1%. Se realizaron 6 lavados centrifugando a 2000 rpm 3', finalmente se resuspendieron en 1mL de PBS/BSA y se cuantificaron en cámara de Neubauer, en una dilución 1:1000 con PBS.

Para recubrir se utilizaron de  $6 \times 10^8$  de eritrocitos que se incubaron con 0.25mg de N-hidroxi-succinimidil-biotina (EZ-link Sulfo-NHS-Biot, Thermo Scientific) disueltos en 250μL de PBS1X, se adicionó esta solución a los eritrocitos y se llevó a un volumen final de 1mL con PBS1X, y se incubó 30' a 4°C en agitación constante. Al finalizar la incubación se realizaron 6 lavados con 500μL de PBS/BSA y se incubaron con 125μL (250μg) de estreptavidina llevando a un volumen final de 500μL con 125μL de PBS2X y 250μL de PBS1X, durante 20' a 4°C, al finalizar se realizaron 6 lavados con 500μL de PBS/BSA y se resuspendieron en 375μL de PBS. Se adicionaron 0.5μL de fragmentos F(ab)<sub>2</sub> (2mg/mL) de anticuerpos de cabra anti Ig-murina biotinilados (Invitrogen), incubando por 30' a 4°C. Se realizaron finalmente 6 lavados más con 500μL de PBS/BSA y se resuspendieron en 1mL de PBS/BSA (Figura 11). Para realizar los ensayos se cuantificaron 1μL de una suspensión 1:100 de eritrocitos en cámara de Neubauer.

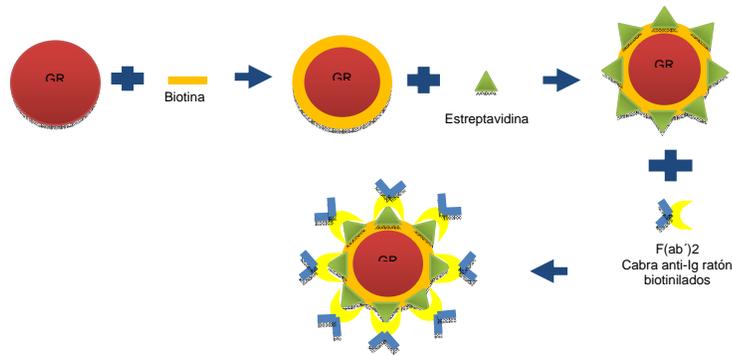


Figura 11. Recubrimiento de eritrocitos de carnero con un tratamiento de biotina-estreptavidina-fragmentos F(ab)<sub>2</sub> cabra anti-Ig ratón biotinilados.

### 8.8 Ensayo para la cuantificación de especies reactivas de oxígeno

Para determinar la formación de ROS, se utilizaron dos formas diferentes de estimulación: con partículas (eritrocitos de carnero) o induciendo el entrecruzamiento del receptor con anticuerpos solubles, fragmentos F(ab)<sub>2</sub>.

#### a. Estimulación con eritrocitos recubiertos de fragmentos F(ab)<sub>2</sub>

Un día antes del ensayo los macrófagos se despegaron, cuantificaron y se determinó la viabilidad por la internalización de azul tripano (dilución 1:10). Se colocaron  $1 \times 10^5$  células viables de la suspensión celular por pozo y se llevaron a un volumen final de 200  $\mu$ L con medio RPMI-1640 (Gibco) al 5% de SFB. En placas de 96 pozos para fluorescencia negras con fondo claro (Corning). Se incubó la placa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por toda la noche para que las células se adhirieran en ella.

Al siguiente día, se agregaron a las células 2  $\mu$ g de anticuerpos anti-receptor de ratón anti-humano (anticuerpo completo): 32.2 (anti-Fc $\gamma$ RI), IV-3 (anti-Fc $\gamma$ RII) o 452 (anti-CD13) y se incubaron por 30' a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente se eliminó el medio y el anticuerpo excedente por inversión de la placa y se adicionaron 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>DFF-DA (concentración final 10  $\mu$ M) (Invitrogen) en Solución Balanceada de Hank's (SBH) por pozo, se incubaron cubiertos de la luz 30' a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Al finalizar la incubación se retiró la solución excedente por inversión y se adicionó SBH necesaria para tener un volumen final de 100  $\mu$ L considerando el volumen de los estímulos. El estímulo para estos experimentos son los glóbulos rojos con F(ab)<sub>2</sub> (GRFab's) que se colocan en una proporción de 10:1 con relación a las células.

Las lecturas de fluorescencia se realizaron en un fluorómetro para placas de 96 pozos (Turner BioSystem). Se determinó la fluorescencia inicial leyendo con un filtro azul ( $\lambda$  de excitación 480nm,  $\lambda$  de emisión 510-570nm). Posteriormente se colocó el estímulo y se realizó una cinética en la que se tomaron lecturas de fluorescencia a intervalos de 5 minutos, durante 1 hora 30 minutos, con temperatura constante de 37°C. Los resultados se expresaron en unidades relativas de fluorescencia (URF).

Al terminar la cinética se retiró el medio y se sumergió en agua destilada por algunos segundos, para eliminar los eritrocitos no fagocitados. Posteriormente se lavó 2 veces con PBS 1X, hasta asegurarse de que ya no existan eritrocitos fuera de las células; después del último lavado se conservaron a las células en PBS. Posteriormente se observaron las células en el microscopio óptico y al microscopio de fluorescencia.

b. Estimulación con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> solubles.

En el caso de esta condicione, el estímulo adicionado fueron fragmentos F(ab)<sub>2</sub> solubles (10µg), que se adicionaron antes de leer en el fluorómetro, supliendo a los GRFabs que de describe en el ensayo anterior, trabajando las mismas condiciones experimentales.

### **8.9 Cuantificación de la fagocitosis de eritrocitos de carnero por diaminobencidina (DAB)**

Este método se basa en la actividad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina que cataliza la conversión de 3,3-diaminobenzicida (DAB) a un compuesto colorido en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el compuesto colorido es medido espectrofotométricamente a 492 nm.

En un placa de cultivo celular de 96 pozos se colocaron 1X10<sup>5</sup> macrófagos por pozo, se dejan incubando a 37°C, en atmosfera con 5%CO<sub>2</sub> por toda la noche en 200µL de RPMI con 10% de SFB; se colocó el anticuerpo anti-receptor: IV-3 (FcγRII), 32.2 (FcγRI) o 452 (CD13) y se incubó por 30´ a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente se eliminó el medio y el anticuerpo excedente por inversión de la placa y se adicionó el volumen necesario de Solución Balanceada de Hank´s (SBH) para llevar a un volumen final de 100µL considerando el estímulo.

El estímulo para estos experimentos son los glóbulos rojos de carnero con F(ab)<sub>2</sub> cabra anti-IgG de ratón (GRFab's) que se colocaron en una proporción de 10:1 con relación a las células.

Se incubaron por 30' a 37°C, en atmosfera con 5% CO<sub>2</sub> para permitir la fagocitosis de GRFabs. Transcurrido el tiempo, se lavó la placa sumergiéndola en agua destilada por algunos segundos, para eliminar los eritrocitos no fagocitados. Posteriormente se lavó 2 veces con PBS 1X, hasta asegurarse de que ya no existan eritrocitos fuera de las células; después del último lavado se retiró el sobrenadante por inversión de la placa eliminando todo el PBS.

Los macrófagos se lisaron con 100µL de una solución de duodecil sulfato de sodios (SDS) al 0.3% en PBS1X por 5', se agregaron 200µL de la solución para revelar (0.004g de 3,3-diaminobenzidina y 120µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disueltos en 10mL de PBS1X). Se leyó el color de la reacción después de aproximadamente 15' a 492nm en un espectrofotómetro para ELISA (Labsystems multiskan Ascent).

### **8.10. Análisis estadístico**

Para determinar diferencias entre las ΔURF de cada una de las condiciones experimentales se llevó a cabo una prueba estadística t-student para muestras independientes, considerando diferencias significativas los tratamientos que obtuvieron una  $p \leq 0.05$ .

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Purificación de monocitos

Para evaluar el grado de pureza de monocitos aislados de sangre periférica, se realizó una tinción con anti-CD14, el cual es un marcador de monocitos/macrófagos. Obtuvimos regularmente >90% de células positivas (Figura 12).

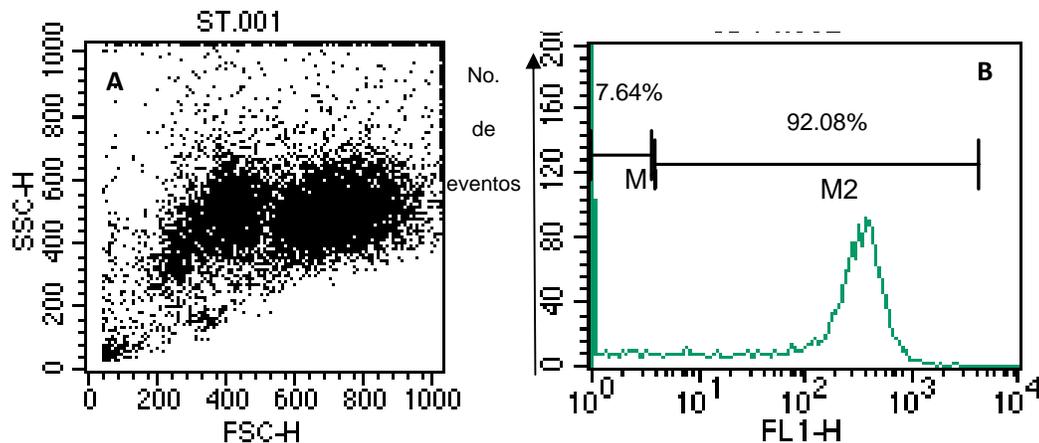


Figura 12. Dot plot (A) e histograma (B) de la purificación de monocitos aislados de sangre periférica por gradiente de densidad.

Un porcentaje mayor al 90% de la población total de las células aisladas y enriquecidas por adherencia, con respecto a las células sin teñir, es considerado un buen aislamiento para permitir la diferenciación a macrófagos tras 6 días en medio RPMI suplementado con 5% de suero fetal bovino.

### 9.2 Reducción de Nitroazul de tetrazolio por la fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados con anticuerpos anti-DNP

Nuestro primer objetivo fue estandarizar una metodología que permitiera cuantificar el estallido respiratorio en macrófagos. El primer método ensayado fue la reducción de Nitroazul de tetrazolio, el cual al ser reducido forma un compuesto (formazán) insoluble.

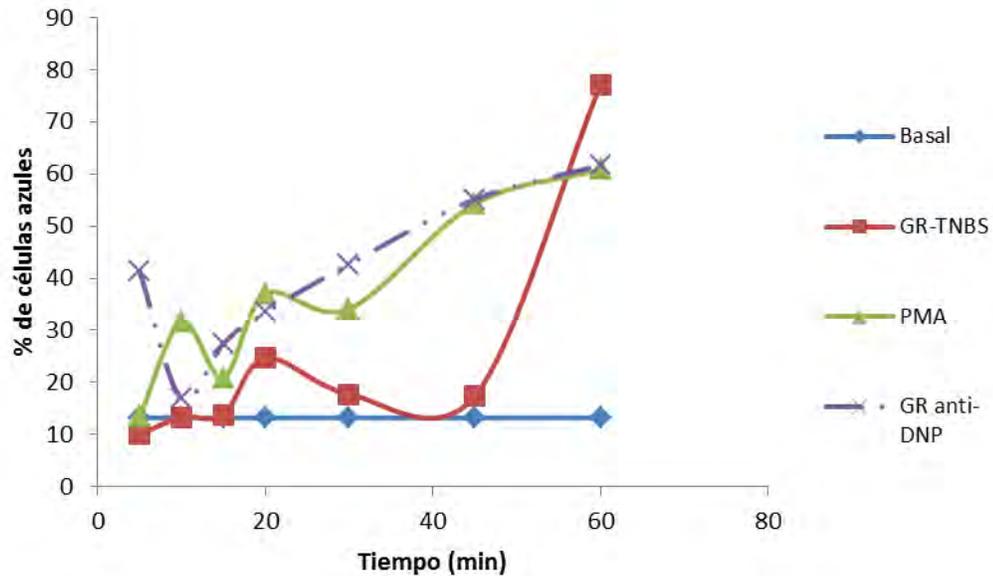


Figura 13. Porcentaje de células que redujeron NBT al fagocitar GR-TNBS o GR  $\alpha$ -DNP. Control positivo acetato de miristoato de forbol (PMA) 50 ng/mL. En el eje de las abscisas se encuentra el porcentaje de células donde se observó el precipitado de formazán con relación al tiempo del estímulo. Cada punto en la curva representa el promedio de 3 experimentos.

La fagocitosis de eritrocitos recubiertos con IgG policlonal anti-DNP por los macrófagos, produce especies reactivas de oxígeno capaces de reducir el NBT en formazán, en cantidades similar a las que se producen por PMA. Los eritrocitos sólo tratados con TNBS producen menos ROS. La cinética indica que las especies ROS se acumulan constantemente aumentando el porcentaje de células con formazán precipitado en el interior (Figura 13).

Aunque logramos ver un aumento en el porcentaje de células que reducen al NBT, la variabilidad de la técnica y el grado de subjetividad que está involucrado en la evaluación por microscopia de la cantidad de formazán precipitado, hacen que no sea una prueba práctica para nuestro estudio.

### 9.3 Citometría de flujo

#### 9.3.1 Expresión de Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y CD13 en macrófagos derivados de monocitos

Se determinó la expresión de Fc $\gamma$ RI (32.2), Fc $\gamma$ RII (IV-3) y CD13 (452) de los macrófagos que serían utilizados para el ensayo de ROS, con el objetivo de conocer si el nivel de expresión de estos receptores era similar entre los diferentes

donadores estudiados. En la Figura 14A se muestra un histograma que indica el nivel de expresión de cada uno de los receptores en una muestra de macrófagos derivados de monocitos aislados de sangre periférica de un donador sano. La Figura 14B muestra la tendencia en la expresión de los receptores para seis donadores. El receptor que se expresa en mayor proporción es CD13 seguido de FcγRII, con valores de media geométrica de fluorescencia (MGF) promedio de 104.02 y 126.21 respectivamente, sin ser significativamente diferentes entre ellos. Cabe destacar que el anticuerpo anti-FcγRII clona IV.3 reconoce el dominio extracelular del receptor, por tal hecho, se está midiendo la expresión de la subclase activadora e inhibitoria a la vez. Como se observa en la Figura 14B, FcγRI es el receptor que se expresa en menor proporción, en estas células con MGF promedio de 34.14.

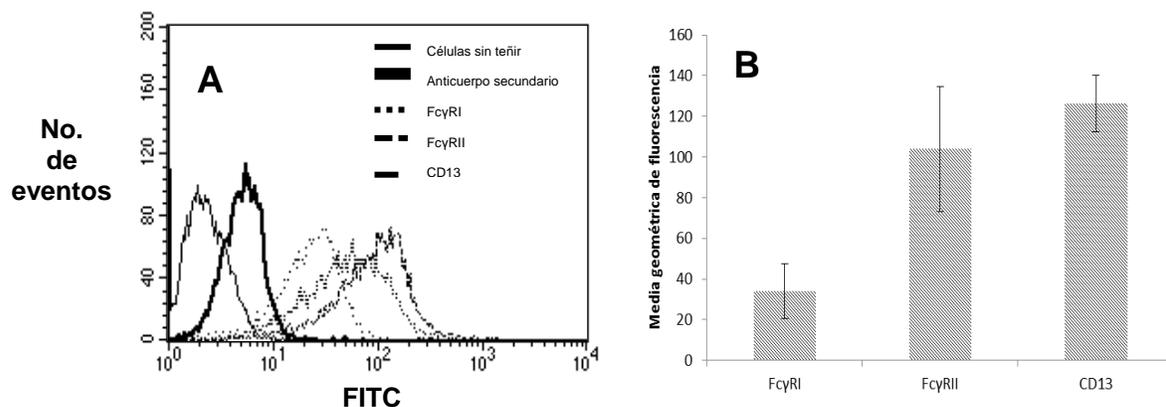


Figura 14. Expresión de FcγRI, FcγRII y CD13 en macrófagos derivados de monocitos aislados de sangre periférica. A) Los macrófagos utilizados para el ensayo de ROS se les determinó mediante citometría de flujo la expresión de los receptores de interés. Se realizó una inmunofluorescencia indirecta de  $4 \times 10^5$  células, marcando inicialmente las células con el anticuerpo anti-receptor, y posteriormente tiñendo las células con un segundo anticuerpo marcado con FITC, cabra anti-ratón. La figura A muestra un histograma de FACS representativo. B) Media geométrica de fluorescencia que indica el nivel de expresión del receptor en la célula. Los resultados mostrados son el promedio y la desviación estándar de 6 donadores.  $P \leq 0.05$

### 9.3.2 Ensayos de producción de especies reactivas de oxígeno con estímulo por PMA. Detectados por citometría de flujo.

El  $H_2DFF$ -DA y Dihidroetidio (DHE) son colorantes que al encontrarse en presencia de ROS se oxidan y se convierten en compuestos fluorescentes capaces de ser medidos por citometría de flujo. Ofrecen mayor sensibilidad de detección y son afines a algún tipo de especie reactiva, en el caso del  $H_2DFF$ -DA

a hidroperóxidos y el DHE a superóxido. Con el objetivo de realizar una cuantificación más objetiva del estallido respiratorio, se realizaron ensayos de producción de ROS con ambos colorantes. Para estos ensayos se utilizó PMA un activador de la cinasa PKC, la cual fosforila las subunidades de la NADPH oxidasa, *p47-phox* y *p67phox*.

Los histogramas en la Figura 15 muestra la producción de ROS en macrófagos tratados con diferentes concentraciones de PMA; A, B y C se realizaron cargando las células con H<sub>2</sub>DFF-DA y el histograma D fue utilizando DHE, como colorante. Utilizando H<sub>2</sub>DFF-DA se realizaron experimentos variando la concentración de PMA estimulando las células durante 30 minutos, según lo reportado en la literatura. Las líneas delgadas son los histogramas de las células que no recibieron ningún estímulo (basal), y las curvas gruesas representan las células que tuvieron PMA durante 30 minutos. Para el caso del histograma D donde el colorante utilizado fue DHE, la línea delgada representa el basal y la línea gruesa las células estimuladas con PMA a una sola concentración, de 100ng/mL.

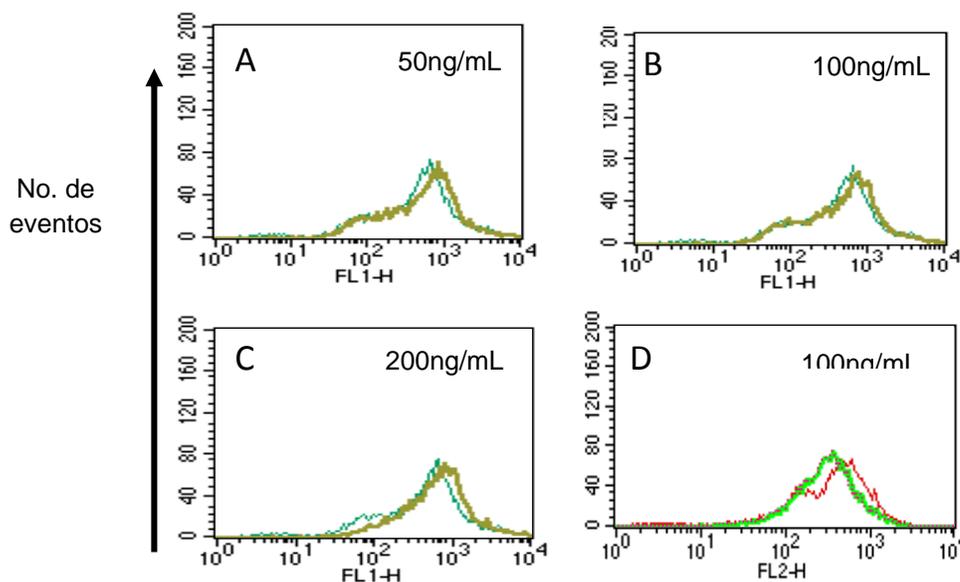


Figura 15. Histogramas representativos de FACS de la producción de especies reactivas de oxígenos por macrófagos, después del estímulo con diferentes concentraciones PMA (líneas gruesas) o el vehículo (líneas delgadas; basal), detectados por la fluorescencia de H<sub>2</sub>DFF-DA (A,B,C) y DHE (D). A. 50ng de PMA. B y D. 100ng de PMA. C. 200ng PMA. Los resultados mostrados se refieren a un experimento representativo.

Con ninguna de las concentraciones de PMA probadas se observó un desplazamiento significativo de la curva que indique una diferencia en la producción de especies reactivas de oxígeno. Utilizando el DHE a una concentración de las probadas con el H<sub>2</sub>DFF-DA, se observa que la curva del estímulo con PMA se desplaza ligeramente a la izquierda, lo que indica una menor producción de especies reactivas.

La Figura 16 muestra los valores de la intensidad media de fluorescencia de los histogramas. La fluorescencia de las células marcadas con H<sub>2</sub>DFF-DA aumenta pero no significativamente en las primeras dos concentraciones de PMA, sólo a los 200ng/mL de PMA hay un diferencia significativa con respecto al basal de aproximadamente 150 unidades, sin embargo, estas concentraciones de PMA son muy altas y podría producir toxicidad celular.

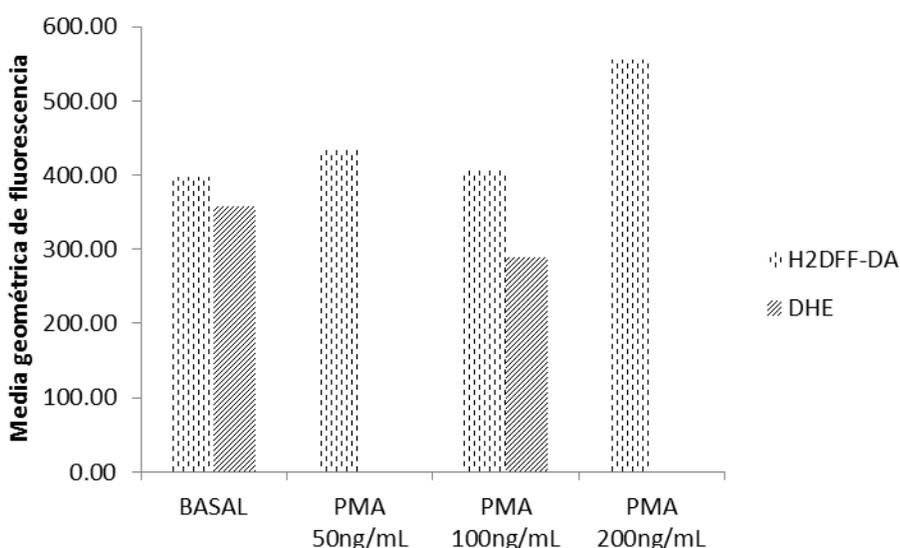


Figura 16. Media geométrica de fluorescencia de la producción de ROS por macrófagos, tras el estímulo con PMA a diferentes concentraciones, determinadas por citometría de flujo. El gráfico muestra la comparación en la intensidad de fluorescencia media medida por H<sub>2</sub>DFF-DA (barras claras) y DHE (barras oscuras). Los resultados mostrados refieren a un experimento representativo.

La citometría de flujo no resultó un método que nos permitiera demostrar cambios estadísticamente significativos, entre las células no estimuladas y estimuladas con PMA.

#### **9.4 Ensayos de producción de especies reactivas de oxígeno detectados por fluorimetría**

Debido a que en los experimentos anteriores utilizando citometría de flujo, no encontramos diferencias significativas entre células estimuladas y no estimuladas (basal), se utilizó otra metodología que cuantificara la fluorescencia de más de una célula para hacer más sensible el método de medición de ROS a los cambios en fluorescencia. Se utilizó la fluorimetría debido a que en esta metodología se observa la suma de fluorescencia de todas las células presentes en el pozo.

Por comodidad en el procedimiento experimental se generaron cinéticas de producción de ROS durante 80 minutos de estimulación. Sin embargo, sólo se consideró para el análisis estadístico el valor neto de la producción de ROS definido como  $\Delta URF$  (delta de unidades relativas de fluorescencia), que indica la fluorescencia inicial del colorante y la fluorescencia del colorante después de 80 minutos de estímulo, determinada por la ecuación 1. Este cambio de fluorescencia es indicativo de la producción de ROS mediada por un estímulo específico.

$$\Delta URF = URF_{final}(t80) - URF_{inicial}(t^0) \dots\dots \text{ecuación 1}$$

##### **9.4.1 Producción de ROS acoplada a la fagocitosis de partículas a través de receptores Fc $\gamma$**

Como estímulo para la inducción de ROS se utilizaron dos tipos de partículas que pueden ser fagocitadas: zimosán opsonizado, o eritrocitos de carnero opsonizados o no con IgG. En los ensayos de fluorimetría iniciales se analizó la producción de ROS asociada a la fagocitosis de eritrocitos de carnero tratados con TNBS (compuesto que modifica la membrana del eritrocito uniendo grupos 2,4,6- dinitrofenol (DNP) a las proteínas de la membrana) y opsonizados con anticuerpos anti-DNP. Se utilizaron H<sub>2</sub>DFF-DA y DHE para evaluar la producción de ROS asociada a la fagocitosis. Como control positivo se utilizó la fagocitosis de zimosán opsonizado con suero humano fresco, el cual es reconocido y fagocitado por las células a través del receptor para complemento CR1.

En el caso del H<sub>2</sub>DFF-DA (Figura 17) se observó que se produjeron especies ROS en presencia de los eritrocitos tratados con TNBS y de eritrocitos opsonizados con  $\alpha$ -DNP, que fueron estadísticamente diferentes comparadas con las que se producen de manera basal en las células no estimuladas. Los eritrocitos de carnero (GR) no tratados, no generan la producción de especies reactivas de oxígeno. Los eritrocitos tratados con TNBS y  $\alpha$ -DNP produjeron 18 y 29 veces más especies ROS, respectivamente, que el valor basal, lo cual indica que hay una producción de ROS asociada a la fagocitosis de estos eritrocitos modificados.

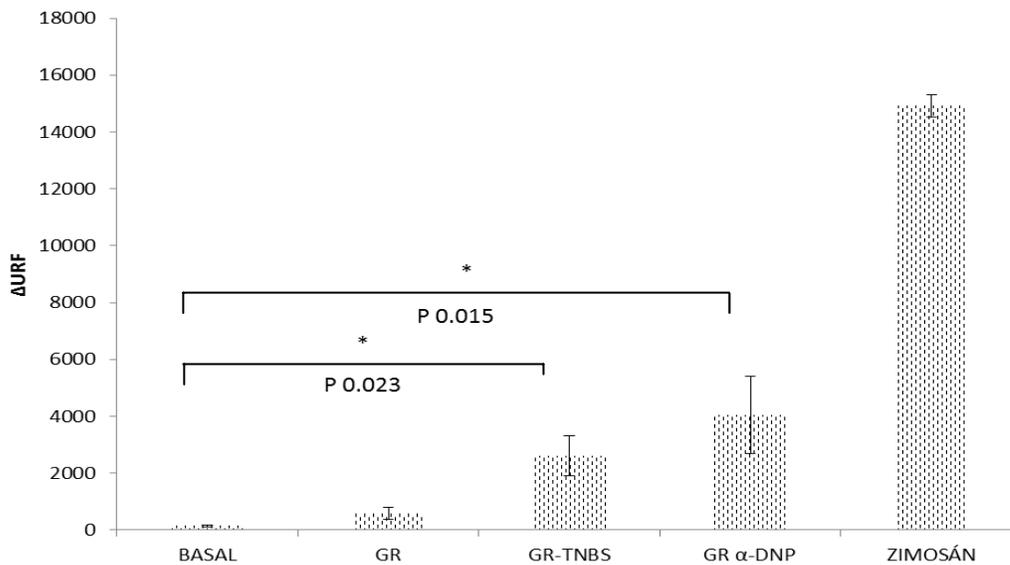


Figura 17. Producción de especies reactivas de oxígenos por macrófagos debido a la fagocitosis de eritrocitos de carnero a través de Fc $\gamma$ Rs. Control positivo Zimosán opsonizado. Se usaron  $1 \times 10^5$  macrófagos marcados con  $10 \mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>DFF-DA, se indujo fagocitosis por adición de glóbulos sensibilizados con TNBS u opsonizados con  $\alpha$ -DNP (policlonal de conejo). Los resultados mostrados son el promedio y la desviación estándar de 3 experimentos. \* $P \leq 0.05$ .

A diferencia del DHE que es reducido preferentemente por el superóxido, el H<sub>2</sub>DFF-DA puede ser reducido por otras especies ROS como peróxido de hidrogeno u otros hidróxidos producidos después de la dismutación del radical superóxido. Debido a esto, era esperable una menor fluorescencia producto de la reducción del DHE. Al observar los gráficos para el caso de la medición por DHE (Figura 18) en el donador 1 se observó que la incubación de las células con GR-

TNBS y GR  $\alpha$ -DNP produjo un incremento de 3 y 2 veces la producción de ROS basal, respectivamente, en comparación con el incremento de 18 veces más que observado para el zimosán. Con las células del donador 2, a pesar de que se observó un incremento de 19 veces inducido por el zimosán, como lo observado en el donador 1, no hay diferencias significativas en la producción de ROS en relación al basal tras incubar las células con los glóbulos rojos tratados. En base a estos resultados, se decidió utilizar H<sub>2</sub>DFF-DA y no DHE, para monitorear la producción de ROS en los siguientes experimentos.

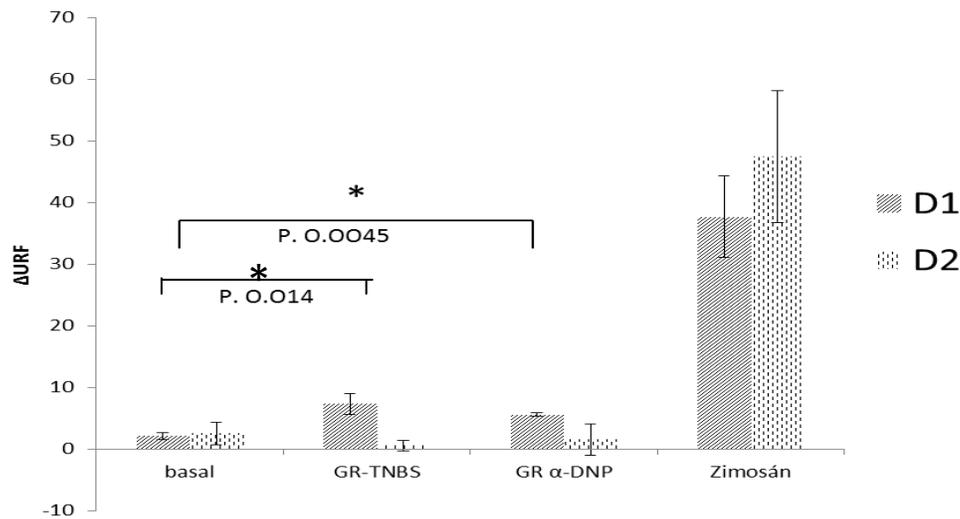


Figura 18. Producción de especies reactivas de oxígeno por macrófagos de donadores sanos o producto de la fagocitosis de eritrocitos de carnero a través de Fc $\gamma$ R de dos donadores sanos. Control positivo Zimosán opsonizado. Se usaron  $1 \times 10^5$  macrófagos marcados con  $8 \mu\text{M}$  de DHE, se indujo fagocitosis por adición de glóbulos sensibilizados con TNBS u opsonizados con  $\alpha$ -DNP (policlonal de conejo). Los resultados mostrados son el promedio y la desviación estándar de 3 experimentos. \* $P \leq 0.05$ .

#### 9.4.2 Producción de ROS inducida por el entrecruzamiento de receptores

Se sabe que el entrecruzamiento de los receptores Fc $\gamma$ R por anticuerpos, es suficiente para inducir las vías bioquímicas de activación, como la fosforilación de Syk, el flujo de calcio, etc. El estallido respiratorio, en neutrófilos, ocurre poco tiempo después de que estos entran en contacto con un organismo extraño, lo cual lo define como un evento temporalmente temprano en la activación de la respuesta inmune. Basados en esta idea se intentó inducir el estallido respiratorio en macrófagos, por el entrecruzamiento de Fc $\gamma$ R con reactivos solubles. Para inducir el entrecruzamiento, las células fueron incubadas con anticuerpos específicos para el Fc $\gamma$ R2, y posteriormente estos se entrecruzaron con

fragmentos bivalentes  $F(ab)_2$  de anticuerpos anti-IgG. Se observó un incremento de sólo 2 veces en la producción de especies ROS con relación al basal para todas las concentraciones de  $F(ab)_2$  solubles adicionadas (Figura 19). A pesar de que para  $2\mu\text{g}$  de  $F(ab)_2$  solubles resulta haber una diferencia estadísticamente significativa, la generación de especies ROS con relación al basal es muy baja, en comparación con lo observado en la fagocitosis de eritrocitos a través de  $Fc\gamma\text{Rs}$  (Figura 17). Esto podría sugerir que se requiere de la fagocitosis de la partícula para poder inducir el estallido respiratorio, y que el estímulo inducido por el entrecruzamiento de los receptores no es suficiente.

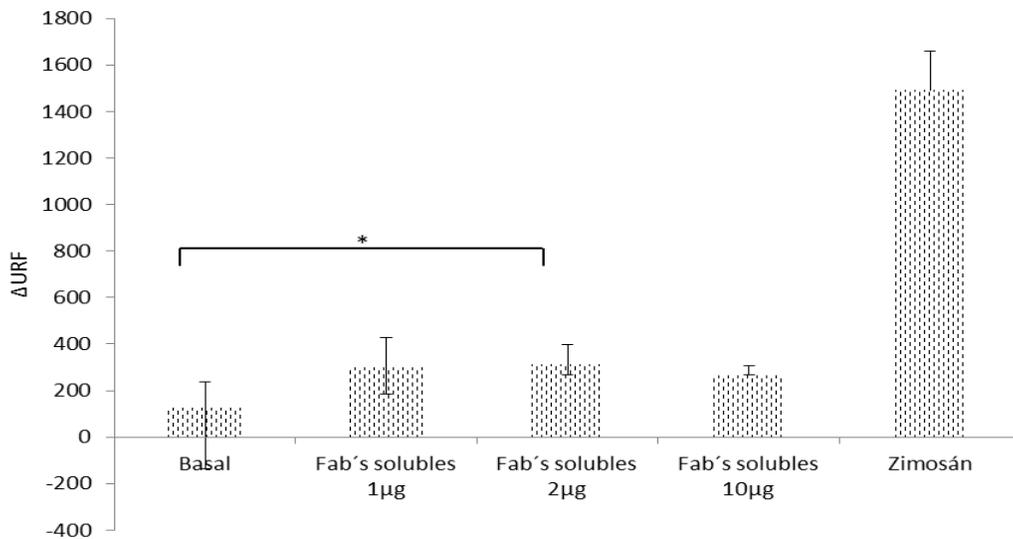


Figura 19. Producción de ROS en macrófagos por el entrecruzamiento del receptor  $Fc\gamma\text{RII}$  con diferentes concentraciones de fragmentos  $F(ab)_2$  de anticuerpos IgG murina. Se usaron  $1 \times 10^5$  macrófagos marcados con  $10\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{DFF-DA}$ , los cuales se preincubaron con  $2\mu\text{g}$  de anticuerpos anti  $Fc\gamma\text{RII}$  (IV-3) durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , y se entrecruzaron los receptores por la adición de diferentes concentraciones de fragmentos  $F(ab)_2$  de anticuerpos IgG murina. Los resultados mostrados son el promedio y la desviación estándar de 3 experimentos.  $*P \leq 0.05$ .

#### 9.4.3 Producción de ROS inducida por fagocitosis específica a través de receptores $Fc\gamma$ .

Para inducir la fagocitosis específica a través de un tipo de receptor  $Fc\gamma\text{R}$  o a través de CD13, se prepararon eritrocitos recubiertos con fragmentos  $F(ab)_2$  de anticuerpos anti-IgG murina producidos en cabra. En la Figura 20 observamos la producción de ROS inducida por el entrecruzamiento del receptor  $Fc\gamma\text{RII}$  y por la fagocitosis específica mediada por el mismo receptor. Para recubrir los eritrocitos se utilizaron diferentes cantidades de fragmentos  $F(ab)_2$  de anticuerpos anti-IgG

murina producidos en cabra, en todos los casos la diferencia en la producción de ROS con respecto al basal, fue estadísticamente significativa, con valores de 3, 21 y 20 veces más especies ROS que las generadas en el basal. Esto contrasta con la producción de ROS al sólo entrecruzar el receptor, que produce un incremento de 3 veces el cual no es estadísticamente significativo. A partir de este ensayo se prepararon los eritrocitos con  $2\mu\text{g}$  de fragmentos  $\text{F(ab)}'_2$  biotinilados cabra anti-ratón, para la fagocitosis específica a través de  $\text{Fc}\gamma\text{RI}$  (CD64),  $\text{Fc}\gamma\text{RII}$  (CD32) y CD13.

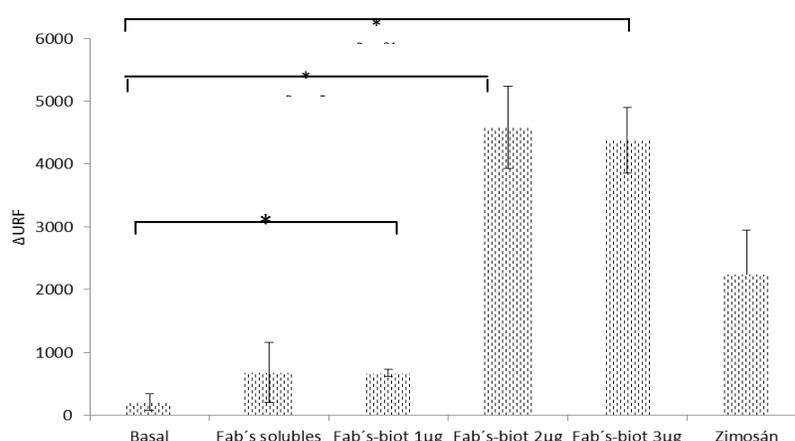


Figura 20. Producción de ROS en macrófagos por el entrecruzamiento de  $\text{Fc}\gamma\text{RII}$  o la fagocitosis de partículas. Efecto del entrecruzamiento de los receptores  $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ . Se usaron  $1 \times 10^5$  macrófagos cargados con  $10\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{DFF-DA}$ , se preincubaron con  $2\mu\text{g}$  de anticuerpos anti  $\text{Fc}\gamma\text{RII}$  (IV-3) durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , los receptores se entrecruzaron por la adición de  $2\mu\text{g}$  fragmentos  $\text{F(ab)}_2$  de anticuerpos IgG murina (Fab's solubles) o la adición de glóbulos rojos de carnero opsonizados con diferentes concentraciones de fragmentos  $\text{F(ab)}'_2$  de anticuerpos IgG murina biotinilados (Fab's biot). Los resultados mostrados son el promedio y la desviación estándar de 3 experimentos. \* $P \leq 0.05$ .

#### 9.4.4 Cinéticas de producción de ROS por fagocitosis específica

Con el objetivo de observar el curso temporal de la producción de ROS se realizó una cinética de especies ROS generadas por la fagocitosis específica a través de  $\text{Fc}\gamma\text{RI}$  (CD64),  $\text{Fc}\gamma\text{RII}$  (CD32) y CD13, midiendo el valor de fluorescencia en intervalos de 5 minutos durante 80 minutos (Figura 21).

A diferencia de otras moléculas utilizadas para medir ROS como el luminol, que al ser reducido emite quimioluminiscencia y va decayendo, el  $\text{H}_2\text{DFF-DA}$  es un colorante que al reducirse se transforma en una molécula que va acumulándose en el interior de la célula. Como podemos observar en la Figura 21

la fluorescencia aumenta con relación al tiempo, lo que nos indica que se está acumulando el  $H_2DFF-DA$  reducido (DFF). El comportamiento de la curva para cada uno de los receptores y para el zimosán es similar, durante los primeros 30 minutos se observa un discreto aumento en la fluorescencia inicial, después de este tiempo hay un aumento diferencial para cada uno de los estímulos. Es importante mencionar que, debido a la presencia de los eritrocitos durante los 80 minutos, las macrófagos siguen en contacto con ellos y pueden continuar fagocitando más partículas si la célula no ha saturado su capacidad, lo que explica que las ROS siguen aumentando a lo largo del experimento.

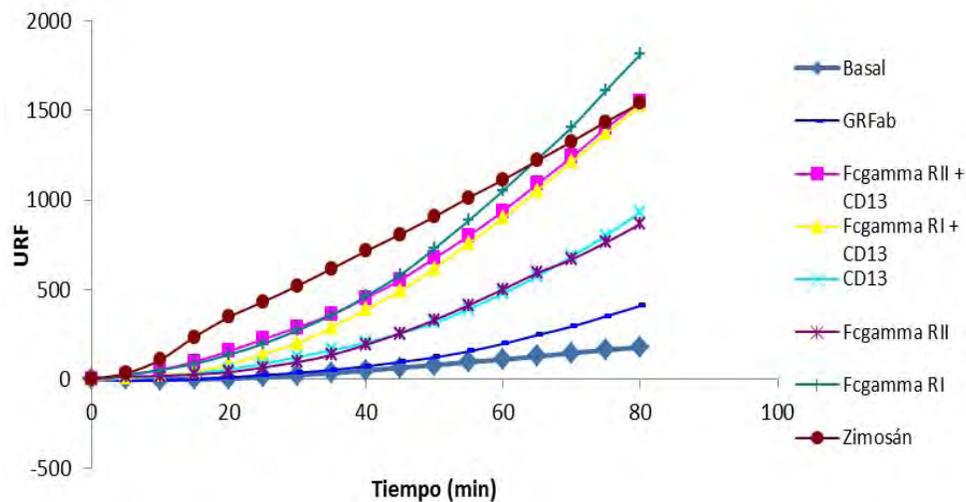


Figura 21. Cinética de producción de ROS por la fagocitosis específica de GRFabs a través de  $Fc\gamma RI$ ,  $Fc\gamma RII$ , CD13 y la combinación de los mismos. Se usaron 100 000 macrófagos cargados con  $10\mu M$  de DFFH-DA, que fueron preincubados con  $2\mu g$  de anticuerpos anti receptor durante 30 minutos a  $37^{\circ}C$ , tras lo cual se añadieron indujo la fagocitosis de glóbulos rojos de carnero opsonizados con fragmentos  $F(ab)_2$  de anticuerpos IgG murina biotinilados (Fab's biot). Se determinó la fluorescencia en intervalos de 5 minutos durante 80 minutos, manteniendo a las células a  $37^{\circ}C$ . Los resultados mostrados son de un experimento representativo.

La curva de producción de ROS en células estimuladas con zimosán muestra, después de los primeros 15 minutos, un incremento constante hasta el minuto 80. Las curvas de las células a las cuales se les añadieron GRFabs, muestran un aumento con relación a la curva basal, lo que sugiere que el tratamiento de los eritrocitos modifica la membrana, de tal modo que provoca la generación de especies reactivas de oxígeno por la célula. Este valor se utilizara como referencia para comparar a la producción de ROS debida a la fagocitosis específica por  $Fc\gamma Rs$  y CD13. La Figura 21 muestra los valores obtenidos con

células de un solo donador, como experimento representativo. Para las fagocitosis específicas mediadas por Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y CD13, observamos que cerca de los 30 minutos se produce un incremento que es dependiente del receptor que se estimule, siendo Fc $\gamma$ RI el que produce mayor cantidad seguido de Fc $\gamma$ RII y CD13 individualmente.

Debido a que los ensayos de ROS se llevaron a cabo con anticuerpo completo, fue necesario incluir un control de isotipo de las IgG. El anticuerpo anti-Fc $\gamma$ RI de la clona 32.2 y el anticuerpo anti-CD13 (452) son de la subclase IgG1a. En la Figura 22, se muestran los valores de  $\Delta$ URF de un donador representativo (diferente al de la Figura 21) donde se encuentran los controles utilizados para el isotipo de Ig utilizado (inmunoglobulina irrelevante IgG1a), para la fagocitosis de partículas (zimosán) y para la producción de ROS inespecífica (GRFabs). Se observa que hay una producción neta de ROS diferente para Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y CD13, que muestran diferencias estadísticamente significativas con relación al valor de los GRFabs

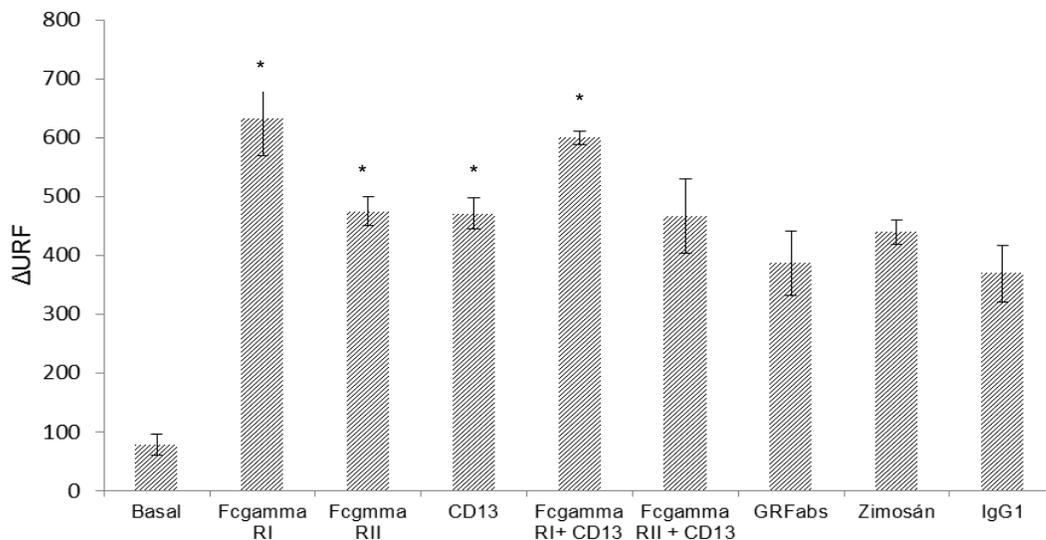


Figura 22. Efecto de la fagocitosis de partículas a través de los receptores Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y CD13. Se usaron  $1 \times 10^5$  macrófagos marcados con  $10 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{DFF-DA}$ , y preincubados con  $2 \mu\text{g}$  de anticuerpos anti Fc $\gamma$ R's, anti CD13 o ambos a la vez durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , se indujo fagocitosis por adición de glóbulos rojos de carnero opsonizados con  $2 \mu\text{g}$  de fragmentos  $\text{F(ab)}'_2$  de anticuerpos anti- IgG murina biotinilados. Control positivo Zimosán opsonizado ( $2 \text{mg/mL}$ ). Control de isotipo IgG1a. Los resultados mostrados son el promedio y la desviación estándar de un experimento por triplicado. \* $P \leq 0.05$ . Experimento representativo.

Cuando se realizan trabajos con células provenientes de donadores sanos, la variabilidad individual afecta la reproducibilidad y dificulta el análisis de los resultados. Con el objetivo de observar esta variabilidad y estudiar la producción de ROS mediado por los receptores FcγRI, FcγRII y CD13 en diferentes individuos, se realizaron ensayos de ROS (como el mostrado en la Figura 22) con células provenientes de seis donadores sanos. Al intentar analizar los resultados en conjunto, se observó que entre donadores la variabilidad es muy alta, lo cual no permite observar las diferencias encontradas para cada uno de los receptores estudiados. Debido a esto se analizaron los donadores de forma individual.

En 5 de los 6 donadores CD13 es capaz de inducir la producción de ROS al fagocitar eritrocitos (Figura 23) ya que los valores de  $\Delta$ URF son significativamente diferentes con relación a las ROS producidas por la fagocitosis inespecífica de los GRFabs. El valor neto de la producción de ROS es diferente entre los donadores, observando una máxima producción en el donador 4 y una mínima en el donador 2. Al observar estas células al microscopio de fluorescencia (Figura 24) es visible una intensa producción de especies reactivas de oxígeno; la fluorescencia se encuentra distribuida en todo el interior de la célula; sin embargo, hay puntos focalizados donde la intensidad de fluorescencia es mayor, los cuales coinciden con los eritrocitos internalizados.

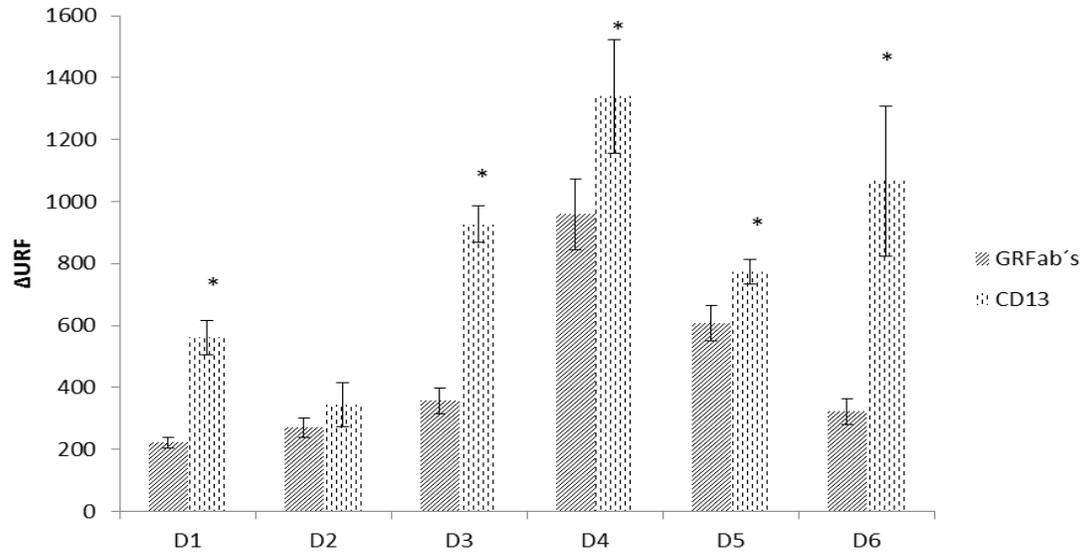


Figura 23.  $\Delta$ URF de la producción de ROS asociada a la fagocitosis específica a través de CD13 comparado con el valor de  $\Delta$ URF asociada a la fagocitosis inespecífica de GRFabs, en células de seis donadores. Se usaron  $1 \times 10^5$  macrófagos marcados con  $10 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{DFF-DA}$ , y preincubados con  $2 \mu\text{g}$  de anticuerpos anti-CD13 durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Se indujo la fagocitosis por la adición de glóbulos rojos de carnero opsonizados con  $2 \mu\text{g}$  de fragmentos  $\text{F(ab)'}_2$  de anticuerpos anti-IgG murina biotinilados (barras claras). La producción de ROS inespecífica es producto de la fagocitosis de los GRFabs (barras oscuras). Los resultados mostrados son el promedio y la desviación estándar de un experimento por triplicado para cada donador.  $*P \leq 0.05$ .

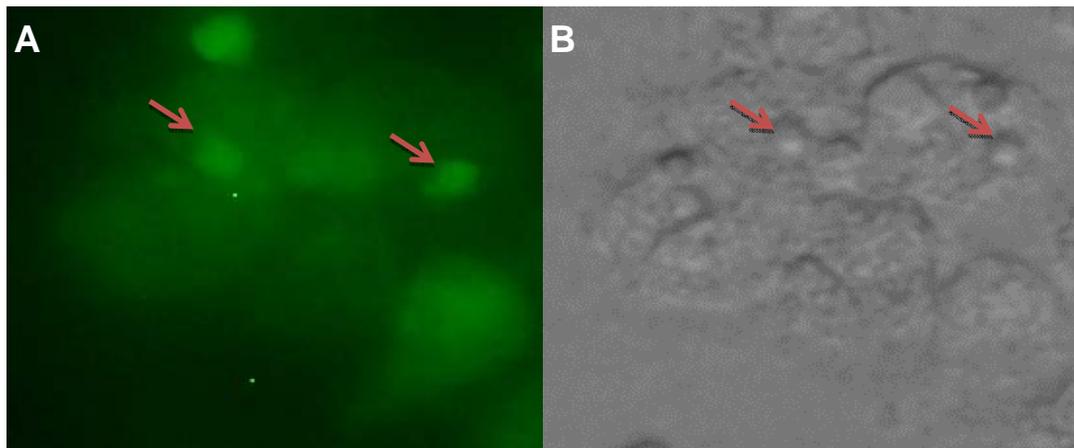


Figura 24. Localización de las especies reactivas de oxígeno producto de la fagocitosis de GRFabs a través de CD13. Macrófagos humanos fueron marcados con  $10 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{DFF-DA}$ , y preincubados con  $2 \mu\text{g}$  de anticuerpos anti-CD13 durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente fueron incubados con GRFabs por 1 hora 30 minutos. Los eritrocitos no internalizados fueron lisados. La microscopía muestra la producción de ROS generada por la fagocitosis de eritrocitos a través de CD13, que se pone en evidencia por la fluorescencia dentro de las células. A. imagen de fluorescencia, B. imagen de campo claro. Aumento 60X.

Para el caso de Fc $\gamma$ RII se observó que aunque en todos los casos el  $\Delta$ URF asociada a la fagocitosis mediada por este receptor es mayor que el de los GRFabs, sólo para tres donadores (D1, D3 y D4) la producción de ROS fue significativamente diferente (Figura 25). Como es de esperarse, la Figura 26 nos muestra que hay una fagocitosis más intensa mediada por Fc $\gamma$ RII que por CD13 (Figura 24), en las células observadas en este campo, hay más de un eritrocito fagocitado por célula. Con relación a la fluorescencia, se puede identificar que la totalidad de la célula es fluorescente, destacando que en una ocasión co-localiza una intensidad mayor de fluorescencia con un eritrocito fagocitado (Figura 26).

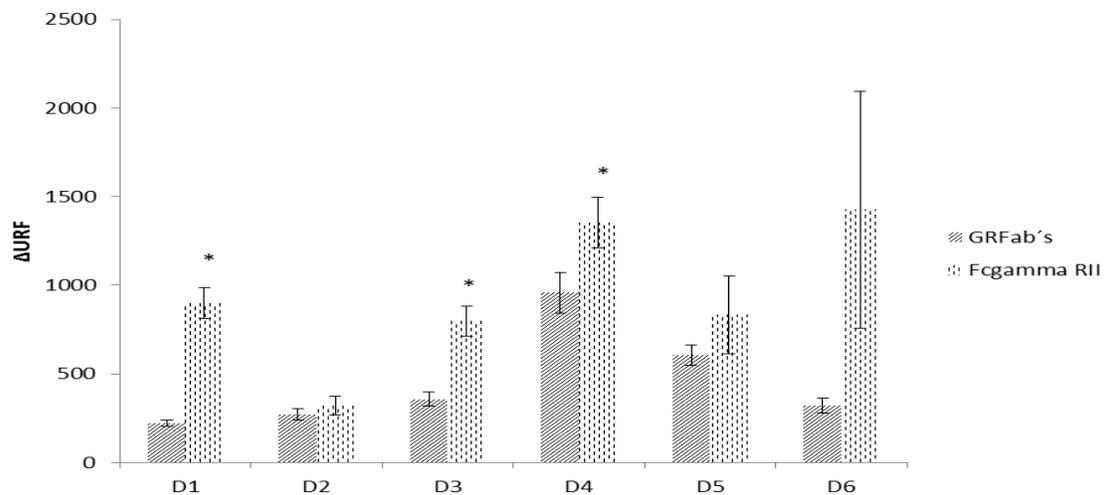


Figura 25.  $\Delta$ URF de la producción de ROS asociada a la fagocitosis específica a través de Fc $\gamma$ RII comparado con el valor de  $\Delta$ URF asociada a la fagocitosis inespecífica de GRFabs, en células de seis donadores. Se usaron  $1 \times 10^5$  macrófagos marcados con  $10 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{DFF-DA}$ , y preincubados con  $2 \mu\text{g}$  de anticuerpos anti-Fc $\gamma$ RII durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Se indujo la fagocitosis por la adición de glóbulos rojos de carnero opsonizados con  $2 \mu\text{g}$  de fragmentos  $\text{F(ab)'}_2$  de anticuerpos anti-IgG murina biotinilados (barras claras). La producción de ROS inespecífica es producto de la fagocitosis de los GRFabs (barras oscuras). Los resultados mostrados son el promedio y la desviación estándar de un experimento por triplicado para cada donador. \* $P \leq 0.05$ .

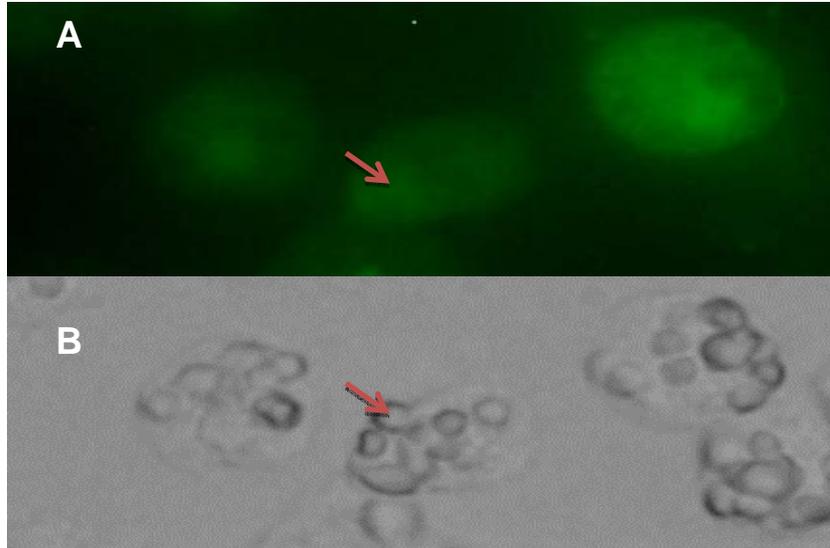


Figura 26. Localización de las especies reactivas de oxígeno producto de la fagocitosis de GRFabs a través de Fc $\gamma$ RII. Macrófagos humanos fueron marcados con 10 $\mu$ M de H<sub>2</sub>DFF-DA, y preincubados con 2 $\mu$ g de anticuerpos anti-Fc $\gamma$ RII durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente fueron incubados con GRFabs por 1 hora 30 minutos. Los eritrocitos no internalizados fueron lisados. La microscopía muestra la producción de ROS generada por la fagocitosis de eritrocitos a través de Fc $\gamma$ RII, que se pone en evidencia por la fluorescencia dentro de las células. A. imagen de fluorescencia, B. imagen de campo claro. Aumento 60X.

La fagocitosis a través de Fc $\gamma$ RI también produce estallido respiratorio con diferencia significativa en todos los donadores (Figura 27), es de los tres receptores estudiados el que presenta una mayor  $\Delta$ URF en promedio (valor promedio de 1292). A pesar de que hay variabilidad en la respuesta entre los donadores, Fc $\gamma$ RI en todos los casos, resultó ser el receptor más eficiente para producir especies reactivas de oxígeno después de la fagocitosis de partículas. La microscopía de la producción de ROS y la internalización de eritrocitos mediada por este receptor (Figura 28), pone en evidencia una marcada fagocitosis a través de Fc $\gamma$ RI, y una amplia producción de ROS en todas las células observadas en ese campo. De igual forma que en el caso de las anteriores imágenes, puede co-localizarse una intensidad de fluorescencia mayor en algunos eritrocitos fagocitados.

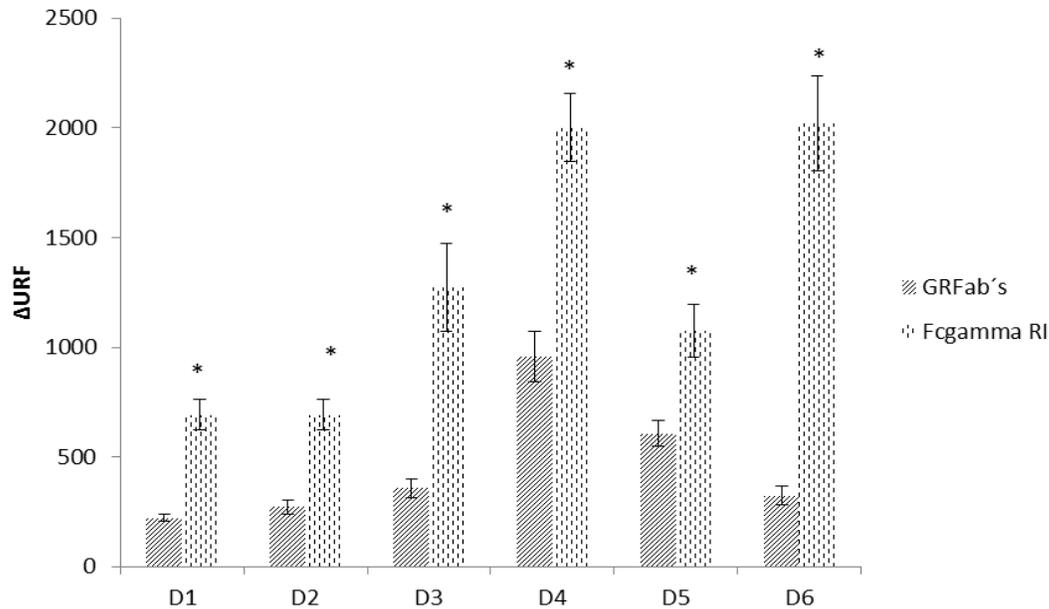


Figura 27.  $\Delta$ URF de la producción de ROS asociada a la fagocitosis específica a través de  $Fc\gamma RI$  comparado con el valor de  $\Delta$ URF asociada a la fagocitosis inespecífica de GRFabs, en células de seis donadores. Se usaron  $1 \times 10^5$  macrófagos marcados con  $10 \mu M$  de  $H_2DFF-DA$ , y preincubados con  $2 \mu g$  de anticuerpos anti- $Fc\gamma RI$  durante 30 minutos a  $37^\circ C$ . Se indujo la fagocitosis por la adición de glóbulos rojos de carnero opsonizados con  $2 \mu g$  de fragmentos  $F(ab)_2$  de anticuerpos anti-IgG murina biotinilados (barras claras). La producción de ROS inespecífica es producto de la fagocitosis de los GRFabs (barras oscuras). Los resultados mostrados son el promedio y la desviación estándar de un experimento por triplicado para cada donador. \* $P \leq 0.05$ .

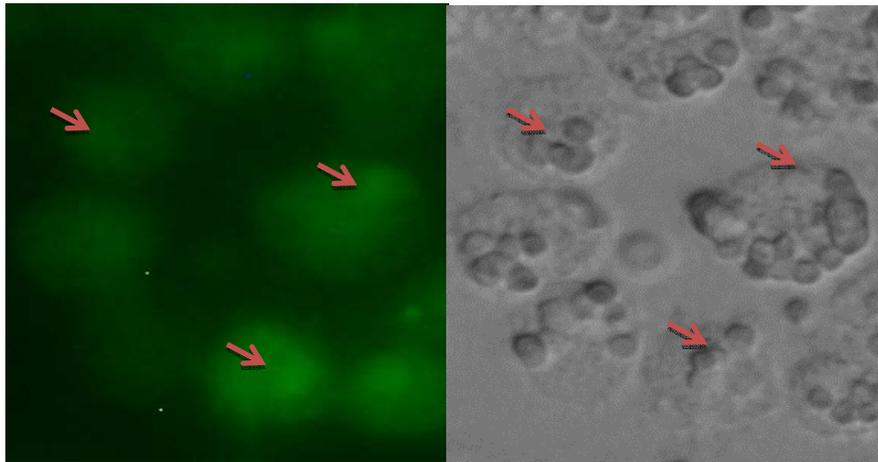


Figura 28. Localización de las especies reactivas de oxígeno producto de la fagocitosis de GRFabs a través de  $Fc\gamma RI$ . Macrófagos humanos fueron marcados con  $10 \mu M$  de  $H_2DFF-DA$ , y preincubados con  $2 \mu g$  de anticuerpos anti- $Fc\gamma RI$  durante 30 minutos a  $37^\circ C$ . Posteriormente fueron incubados con GRFabs por 1 hora 30 minutos. Los eritrocitos no internalizados fueron lisados. La microscopia muestran la producción de ROS generada por la fagocitosis de eritrocitos a través de  $Fc\gamma RI$ , que se pone en evidencia por la fluorescencia dentro de las células. A. imagen de fluorescencia, B. imagen de campo claro. Aumento 60X.

Los resultados mostrados indican que FcγRI, FcγRII y CD13 son capaces de inducir el estallido respiratorio asociado a la fagocitosis específica de eritrocitos de carnero. En los tres casos la reducción del H<sub>2</sub>DFF-DA fue evidenciada por microscopia de fluorescencia al observar la totalidad de la célula fluorescente. Esto puede deberse a que las especies reactivas de oxígeno son capaces de atravesar membranas, como lo sería la membrana del fagosoma formado para la internalización de la partícula; sin embargo, en algunos casos puede co-localizarse un incremento en la fluorescencia con los eritrocitos que fueron fagocitados, esto tiene relación con la producción de ROS compartimentalizada en el fagosoma.

Se había reportado ya que CD13 tiene la capacidad de mediar la fagocitosis de partículas, además de aumentar la fagocitosis mediada por FcγRI, sugiriendo una asociación funcional entre ambas moléculas. Para poder observar si también hay una asociación funcional, CD13-FcγRI o CD13-FcγRII, en la inducción del estallido respiratorio se indujo la fagocitosis por ambos receptores y se cuantificó la producción de ROS por fluorescencia. Con el objetivo de determinar si existía una diferencia entre los receptores estimulados individualmente o en conjunto se realizó una normalización con relación al valor promedio de los ROS generados por los GRFab, para cada donador, utilizando la ecuación 2. Los resultados se presentan a continuación.

Ecuación 2...

**INCREMENTO** ■

$$\Delta_{URF} (Fc\gamma RI, Fc\gamma RI I \text{ o } CD13 \text{ o la suma}) / \Delta_{URF}(\overline{GRFab})$$

Como ya se había mencionado antes, hay una producción diferencial de ROS entre FcγRI, FcγRII y CD13; al analizar el incremento de la producción de ROS con relación a lo observado por los GRFabs, todos tienen un valor mayor a uno, que indica una producción de ROS específica del receptor. Para el caso del FcγRI (Figura 29) podemos observar que solo para el D1 hay diferencias significativas entre la estimulación por cada uno de los receptores y la combinación de ambos; sin embargo, en los donadores restantes sólo se observa que en presencia de FcγRI, la producción de ROS mediada por CD13 se vio

incrementada significativamente, no así la de FcγRI. FcγRI produce un incremento en la producción de ROS de entre 3 y 6 veces, en comparación con CD13 que produce incrementos que varía entre 1.5 y 3, implicando casi el doble de la producción de ROS por FcγRI. Al estimularse los receptores conjuntamente, no se observa un incremento en la fluorescencia, lo cual sugiere que no hay una asociación funcional como la observada en la fagocitosis.

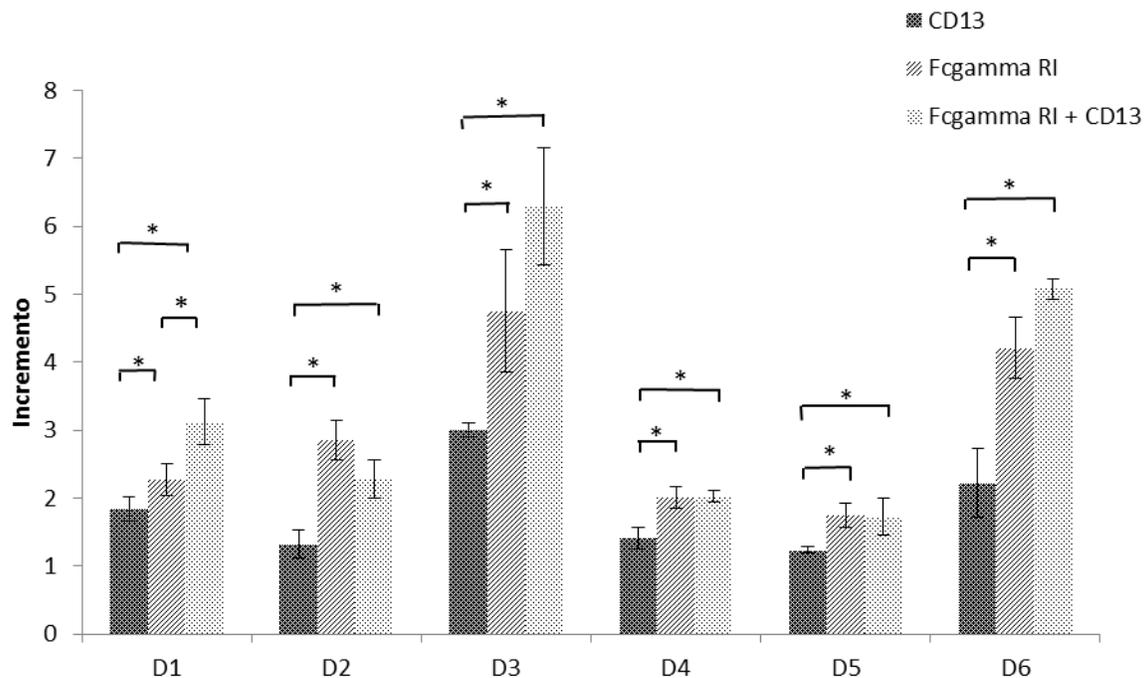


Figura 29. Incremento en la producción de ROS por FcγRI, CD13 y FcγRI + CD13. Se consideró como grupo control el valor de GRFabs para cada donador, el cual fue siempre 1.00, no tiene asociada una desviación estándar (no mostrado). Los resultados mostrados son el promedio y la desviación estándar de triplicados para cada donador. \* $P \leq 0.05$ .

La producción de ROS a través del FcγRII es similar cuantitativamente a la medida por CD13. Sólo en D1 podemos observar una diferencia significativa entre la producción de ROS por FcγRII y CD13 juntos, respecto a la producción de ROS por cada uno de los receptores individualmente. En células de los donadores restantes, la producción de ROS es igual para ambos receptores, y el encontrarse juntos no modifica el valor de fluorescencia medido. Al igual que para CD13 el valor en el incremento para FcγRII varía en valores bajos entre 1.5 y 3.5. Con lo

anterior se sugiere que no hay asociación funcional en entre CD13 y FcγRII en la inducción del estallido respiratorio.

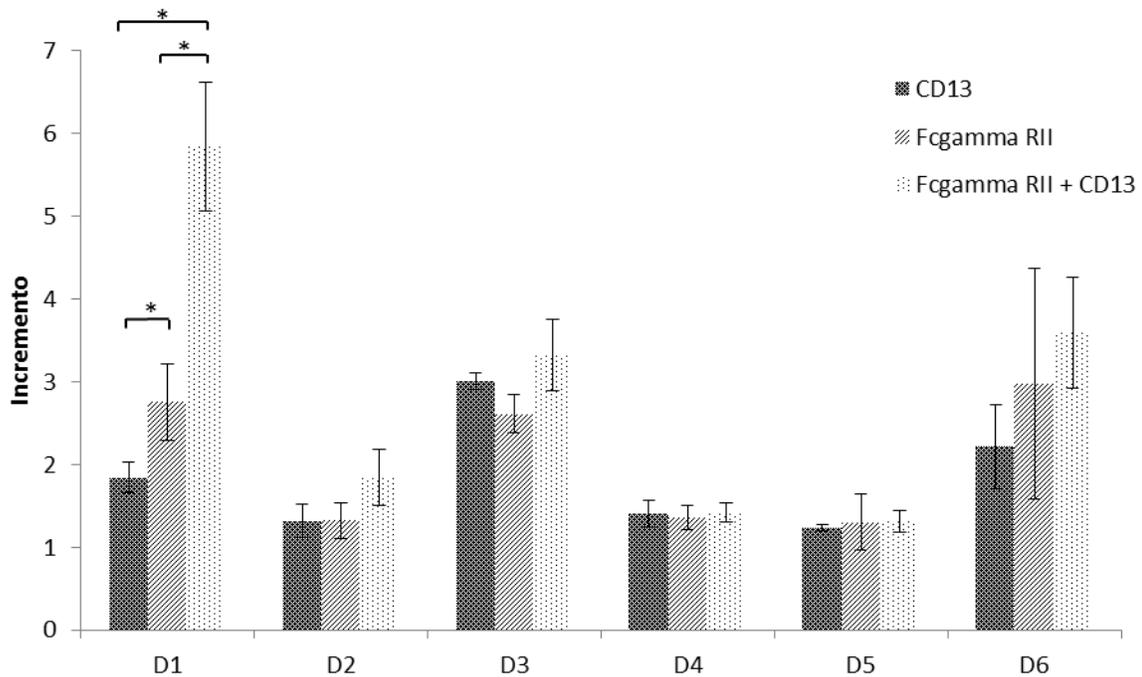


Figura 30. Incremento en la producción de ROS por FcγRII, CD13 y FcγRII + CD13. Se consideró como grupo control el valor de GRFabs para cada donador, el cual fue siempre 1.00 y no tiene asociada una desviación estándar (no mostrado). Los resultados mostrados son el promedio y la desviación estándar de triplicados para cada donador. \* $P \leq 0.05$ .

### 9.5 Relación de la producción de ROS con la fagocitosis

Como ya habíamos observado en el transcurso de los experimentos parece ser necesaria la fagocitosis de la partícula para observar un incremento significativo en la producción de especies ROS. Con el objetivo de relacionar estos dos procesos, se cuantificó por diaminobencidina la fagocitosis específica a través de FcγRI, FcγRII y CD13. La diaminobencidina nos permite cuantificar a través de la actividad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina, los eritrocitos que fueron fagocitados por los macrófagos.

Los valores de fagocitosis y producción de ROS específico, se normalizaron calculando el porcentaje de incremento en relación a la fagocitosis y producción de ROS inespecíficos (GRFabs) para cada donador. Estos valores se graficaron colocando como variable independiente a el porcentaje de fagocitosis y como

variable dependiente el porcentaje de la producción de ROS, con el objetivo de determinar si hay una relación entre ambos procesos.

Para cuatro donadores se midió la fagocitosis y producción de ROS, la Figura 31 representa el comportamiento de estos procesos, con base en lo observado por los coeficientes de correlación de las rectas generadas, no puede demostrarse que existe una relación lineal entre la fagocitosis y la producción de ROS por células de los distintos donadores. De forma cualitativa, se puede describir que en el caso del receptor FcγRI, parece existir una relación inversamente proporcional; es decir, entre mayor sea la fagocitosis menor será la producción de ROS. Para el caso de FcγRII y CD13, parece ser una relación directamente proporcional, si existe una mayor fagocitosis hay una mayor producción de ROS, en nuestras condiciones experimentales. Sin embargo, para poder realizar conclusiones más sólidas, es preciso analizar células de un mayor número de donadores, para determinar si existe algún tipo de dependencia entre estos dos procesos, o si a pesar de que ambos fisiológicamente ocurren en forma simultánea, son independientes uno del otro.

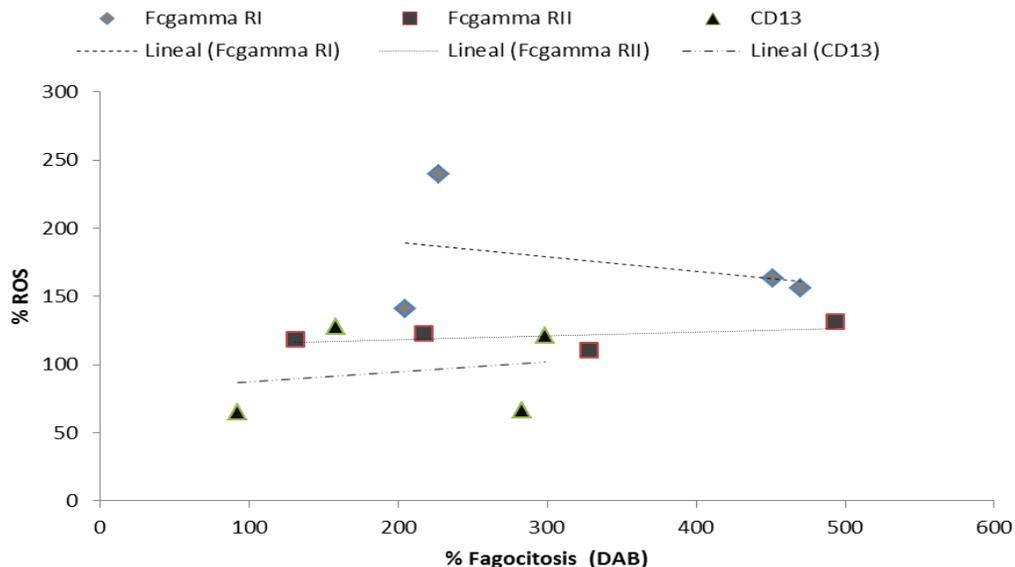


Figura 31. Relación entre fagocitosis específica a través de FcγRI, FcγRII y CD13 y producción de especies reactivas de oxígeno. La fagocitosis fue determinada por la reacción de la hemoglobina con una solución de diaminobencidina (DAB), y se calculó el porcentaje de fagocitosis con respecto al valor obtenido con los GRFabs. De igual forma se determinó el porcentaje de ROS con relación al valor de los GRFabs ( $\Delta$ URF). Se ajustó a una recta lineal los valores, calculando su pendiente y coeficiente de correlación.

## 10. DISCUSIÓN

Los macrófagos son un tipo celular ampliamente estudiado por la gran cantidad de funciones en la respuesta inmune innata y adaptativa en las cuales participan. Junto con las células dendríticas son de las primeras células del sistema inmune que entran en contacto con el patógeno y que pueden mediar las primeras respuestas contra el mismo.<sup>4</sup> Debido a esto, es importante continuar con la caracterización de los receptores que colaboran en el reconocimiento y las funciones efectoras que desempeñan los macrófagos.

Este trabajo tuvo como objetivo determinar si CD13, una molécula ampliamente expresada en macrófagos, puede inducir estallido respiratorio, o si su agregación con los receptores FcγRI y FcγRII puede modular el estallido respiratorio mediado por ellos. Para abordar este problema, se inició con la estandarización de la metodología para medir especies reactivas de oxígeno en macrófagos, eligiendo el método de detección que resultase óptimo. El NBT fue un compuesto útil para poder visualizar la producción de ROS al microscopio óptico; sin embargo, esta es una determinación subjetiva, que depende del precipitado que se logre observar en las células, una mala identificación podría excluir alguna células con poco precipitado. Al intentar hacer el ensayo objetivo, la muy baja solubilidad del compuesto formado (formazán) y la baja cantidad de precipitado presente, impidió poder cuantificarlo mediante un método espectrofotométrico. La reducción del NBT por neutrófilos se usa como diagnóstico presuntivo de la Enfermedad Granulomatosa Crónica;<sup>14</sup> sin embargo, no permitió cuantificar pequeñas diferencias entre la estimulación de macrófagos por diferentes condiciones experimentales. La falta de especificidad con la que reacciona el NBT frente a algunas ROS, impide discriminar producciones bajas de ROS, generando así posibles falsos positivos.

Los compuestos denominados “fluoroforos positivos” son de mayor confiabilidad por la especificidad que ofrecen frente a algunas especies reactivas de oxígeno, y a su vez permiten la cuantificación de concentraciones muy pequeñas de la especie que se está buscando detectar.<sup>17</sup> Aunado a esto, su acumulación dentro de la célula permite inferir la fuente de ROS que se está

cuantificando, la cual debe estar dentro de la célula.<sup>54</sup> La generación de ROS que se esperaba observar en nuestros experimentos está localizada al interior de la célula, por lo que estos compuestos constituían una posible alternativa. Utilizamos el dihidroetidio (DHE) un compuesto con especificidad al ion superóxido,<sup>55</sup> y el diacetato de 5-(y-6)-carboxi-2',7'-difluorodihidrofluoresceína (carboxi-H<sub>2</sub>DFF-DA), que tiene especificidad por los compuestos hidroperóxidos.<sup>17</sup> Este último compuesto es un derivado de la diclorodihidrofluoresceína, que ha sido modificado utilizando flúor sustituyendo a los cloruros en la molécula y un grupo carboxi (Figura 32). Presenta las mismas propiedades reactivas que su análogo clorado, sin embargo, la presencia de estos nuevos componentes le confiere mayor fotoestabilidad.

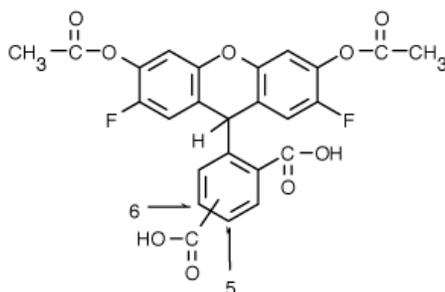


Figura 32. Estructura química del diacetato de 5-(y-6)-carboxi-2',7'-difluorodihidrofluoresceína (carboxi-H<sub>2</sub>DFF-DA)

Utilizando inicialmente la citometría de flujo como metodología para cuantificar estos compuestos, no se logró observar una diferencia significativa entre los histogramas de aquellas células que fueron estimulados con PMA, con relación a aquellas células que no tenían ningún estímulo. El PMA se utilizó como control positivo para el estallido respiratorio, por ser un compuesto que cruza la membrana plasmática y activa la cinasa PKC, la cual es responsable de fosforilar a la subunidad *p47phox* y otras subunidades de la NADPH oxidasa.<sup>13,14,55</sup> Al no lograr observar la diferencia entre todos los tratamientos con PMA, en ambos colorantes, el cual produce una amplia cantidad de especies ROS, utilizando ambos colorantes, se decidió buscar otra metodología.

La fluorimetría presenta algunas ventajas sobre la citometría de flujo, ya que permite cuantificar las ROS como la suma de fluorescencia de más de una célula presente; aunado a esto permitió realizar cinéticas de producción de ROS

cuantificando el colorante en intervalos de 5 minutos durante 80 minutos. Y permite el manejo de un mayor número de muestras.

Con relación a la expresión de los receptores FcγRI, FcγRII y CD13, era para nosotros importante saber cuál era su perfil de expresión en macrófagos. Esto podría tener implicaciones en la producción de ROS, si un receptor es poco expresado, al co-agregarlo podría estar siendo enmascarada su función por el receptor de mayor expresión. Sin embargo, el perfil de expresión de estos receptores y los resultados obtenidos, nos indicaron que ese no era un factor relevante para nuestro problema de estudio.

### **10.1 Fagocitosis de partículas a través de receptores para la fracción contante de los anticuerpos**

En las cinéticas de producción de ROS se utilizó como control positivo zimosán opsonizado, para trabajar un sistema similar a la fagocitosis de eritrocitos. Las partículas de zimosán son obtenidas de la pared celular de levaduras, y están compuestas por una amplia cantidad de carbohidratos y proteínas, que son reconocidas a través de Dectina-1 y TLR2.<sup>56</sup> Cuando el zimosán se opsoniza con suero humano fresco, se deposita C3b sobre la superficie y pueden ser reconocido por CR1, el cual es un receptor fagocítico capaz de inducir el estallido respiratorio.<sup>52</sup>

Cuando se utilizó como partícula fagocítica eritrocitos tratados con TNBS y opsonizados con un antisuero policlonal α-DNP, se produce la fagocitosis de los eritrocitos por los receptores para Fc presentes en los macrófagos, aunque en esta caso no sé sabe cuál o cuáles receptores Fc (I, II o III) pueden estar mediando la fagocitosis. La producción de ROS de eritrocitos tratados con TNBS pero no opsonizados, puede ser producto del reconocimiento a través de receptores scavenger, debido a que el eritrocito es maltratado por el tratamiento es reconocido como dañado,<sup>53</sup> lo que en condiciones fisiológicas es un mecanismo de aclaramiento de eritrocitos deficientes o senescentes.

La proporción de especies reactivas cuantificadas por la reducción del H<sub>2</sub>DFF-DA en comparación con el DHE se espera mayor por las especies que se están cuantificando; sin embargo, no se detectó en las células provenientes de

donadores marcadas con DHE, una diferencia entre la fagocitosis de eritrocitos por los macrófagos con relación al control positivo. Reportes previos indican que la presencia de coordinados octaédricos de  $\text{Fe}^{3+}$  pueden generar la reacción no enzimática del DHE, generando así subproductos del mismo que tienen ondas de excitación y emisión muy cercanas al grupo hemo. Las reacciones secundarias del DHE disminuyen la especificidad y la posibilidad de cuantificar las especies reactivas de oxígeno por este método.<sup>55</sup> Por esta razón se sugiere trabajar en un sistema de fagocitosis donde no estén presentes los eritrocitos. Una alternativa es el uso de perlas de látex recubiertas de fragmentos  $\text{F(ab)'}_2$ , para eliminar la interferencia de la hemoglobina en el ensayo.

## 10.2 Producción de ROS inducida por el entrecruzamiento de receptores

Algunas funciones celulares observadas cuando las células son estimuladas a través de CD13 o de  $\text{Fc}\gamma\text{R}'\text{s}$ , como el flujo de calcio o la fosforilación de Syk<sup>41,42</sup>, pueden ser cuantificadas tras el entrecruzamiento del receptor por un anticuerpo primario (anti-receptor) y la adición de un anticuerpo secundario como  $\text{F(ab)'}_2$  solubles de anticuerpos anti-IgG de ratón producidos en cabra. Basados en esta premisa inicialmente se intentó inducir una respuesta de producción de ROS similar a la observada asociada a la fagocitosis a través de la  $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ , mediante el entrecruzamiento del receptor con un anticuerpo monoclonal (IV-3) y fragmentos  $\text{F(ab)'}_2$  solubles. Los resultados obtenidos demostraron que los  $\text{F(ab)'}_2$  solubles en el medio no fueron capaces de generar la misma cantidad de ROS que la fagocitosis de una partícula (Figura 20). Aún en presencia de un exceso de fragmentos para entrecruzar, podrían no estar interactuando de forma eficiente para inducir un umbral de señal capaz de activar el ensamblaje de la NADPH oxidasa.

Algunas de las cinasas responsables de la activación de la NADPH oxidasa como p38 MAPK, PI3K y PKC<sup>33</sup> o la GTPasa pequeña Rac, que se encuentran por debajo de Syk en la vía de señalización,<sup>35</sup> podrían requerir de una más prolongada o intensa interacción con el receptor para inducir la producción de ROS, como sucede en el caso de la fagocitosis.<sup>59</sup> En condiciones fisiológicas la producción de ROS no compartimentalizada, como en el caso de la fagocitosis

frustrada,<sup>57</sup> puede ser el origen de una inflamación no controlada y daño a tejido adyacente al sitio de infección.<sup>33,34</sup>

### 10.3 Producción de ROS por fagocitosis específica

Se denomina fagocitosis específica por estar mediada a través de un receptor en particular, FcγRI (32.2), FcγRII (IV.3) o CD13 (452), por la interacción con su anticuerpo específico y el posterior entrecruzamiento con un anticuerpo secundario (fragmentos F(ab)<sub>2</sub>). Al estimular la producción de ROS por la fagocitosis de GRFabs se produce una robusta intensidad de fluorescencia, las cinéticas generadas permitieron observar el comportamiento temporal de la producción de ROS.

En la Figura 21 se presenta una cinética de 80 minutos, la que permite observar la acumulación del compuesto fluorescente. Cabe destacar que el estímulo permanece presente, los eritrocitos se encuentran en contacto con los macrófagos que sean capaces de seguir fagocitando y así mismo seguir produciendo ROS. Existen reportes previos donde a diferencia de otros compuestos como el luminol que presentan un pico de quimioluminiscencia<sup>15</sup> y decae rápidamente, el H<sub>2</sub>DFF-DA o sus análogos clorados se acumulan en el interior de la célula.<sup>45,54</sup> En una etapa inicial en la cinética de producción de ROS, podemos observar que no existe un cambio notorio en la intensidad de fluorescencia, lo cual podría tener explicación por el tiempo requerido para la formación de la copa fagocítica y ensamble de la NADPH oxidasa<sup>12</sup>. Después de 30 minutos empieza a presentarse un incremento del producto oxidado, el cual es diferente para cada uno de los receptores. Después de los 30 minutos, es muy posible que una gran proporción de los macrófagos presentes hayan fagocitado al menos un eritrocito y algunos otros macrófagos sean capaces de seguir fagocitando. El aumento en la fluorescencia puede deberse a la capacidad de cada uno de los receptores para generar especies reactivas de oxígeno, teniendo entre ellos eficiencias diferentes.

Como ya se había mencionado anteriormente respecto a los eritrocitos tratados con TNBS, la modificación en la membrana que puedan tener después del tratamiento con biotina y estreptavidina en su membrana, permitirá una valor

de producción de ROS inespecífica, mediada por algunos receptores como los scavenger,<sup>53</sup> por el reconocimiento a los eritrocitos como maltratados y la subsecuente eliminación, como sucede con los macrófagos residentes en el bazo.<sup>4</sup> Por esta razón es con relación a este valor que se compara cada valor de la producción de ROS mediada por los receptores, para determinar un valor específico de estimulación de un receptor particular.

**10.3.1 CD13** es capaz de inducir fagocitosis mediada por la activación de Syk y otras cinasas<sup>41</sup> y puede a su vez colaborar en la fagocitosis mediada por FcγRI<sup>41,42</sup>. También se ha observado que CD13 puede inducir la movilización de calcio<sup>42</sup>, esto podría ampliar la posibilidad de que CD13 induzca la producción de ROS, como otros receptores fagocíticos (Tabla 2). En la Figura 23 podemos observar que en los seis donadores analizados la producción de especies reactivas de oxígeno a través de CD13, es estadísticamente significativa con relación a la producción de ROS inespecífica, lo que nos sugiere que CD13 es capaz también de inducir la producción de especies reactivas de oxígeno después de la fagocitosis de partículas. En la microscopia de fluorescencia mostrada en la Figura 24 podemos observar que existe una intensidad de fluorescencia mayor en algunos eritrocitos fagocitados, apoyando la hipótesis de que la fagocitosis es importante para compartimentalizar la generación de ROS dentro del fagosoma. Por lo tanto, CD13 puede ser un receptor que induzca también el ensamble de la NADPH oxidasa en el fagosoma.<sup>54</sup> No publicaciones en las cuales se reporte que CD13 colaborara de alguna forma en la producción de especies reactivas de oxígeno. En septiembre del 2010 se reportó, contrario a lo que se observa en estos resultados, que la sobreexpresión de CD13 en células troncales de cáncer hepático resulta en una disminuida producción de especies reactivas de oxígeno<sup>44</sup>, lo que probablemente esté relacionado con su resistencia a la quimioterapia. La producción de especies reactivas de oxígeno en este sistema difiere de la que se lleva a cabo al estimular la fagocitosis, debido a que en la quimioterapia se producen ROS independientemente del ensamble de la NADPH oxidasa.

**10.3.2 FcγRI y FcγRII** están reportados como receptores fagocíticos y que inducen la producción de especies reactivas de oxígeno por el ensamble de la NADPH oxidasa<sup>29-35</sup>. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que FcγRI y RII inducen estallido respiratorio; sin embargo, en el caso del receptor FcγRII la variabilidad entre los donadores parece ser más amplia, además de que el valor de la producción de ROS es similar al que se observa con CD13. FcγRII se encuentra expresado no sólo en fagocitos profesionales, también es expresado por células endoteliales y placentarias, entre otras,<sup>30</sup> al igual que CD13 se encuentra ampliamente expresado.<sup>39</sup> Una alta producción de ROS mediada por estos receptores podría generar daño a tejido y no compartimentalización de la producción de ROS en el fagosoma, como lo que sucede para otras enzimas de la familia de Nox,<sup>11</sup> que no generan ROS en respuesta de un estímulo fagocítico y liberan estas especies reactivas al interior de la célula desencadenando un daño secundario tras la activación de estos receptores. CD13 y FcγRII también presentan un nivel similar de expresión, lo cual apoya más las similitudes entre ambos receptores en la producción de especies reactivas de oxígeno.

Es importante tomar en cuenta que el anticuerpo utilizado para estimular a través de FcγRII, reconoce el dominio extracelular del receptor, al entrecruzarlo se activan tanto las subclases activadoras como la inhibitoria. Esta podría ser la razón por la cual en este receptor se observa la mayor variabilidad entre los donadores.

Por otro lado el FcγRI se encuentra constitutivamente expresado en células fagocíticas junto con la subunidad γ.<sup>29</sup> En la Figura 27 observamos que la producción de ROS producto de la fagocitosis mediada por este receptor es significativamente diferente en todos los donadores con relación a la producción de ROS inespecífica y es más alta que la mediada por CD13 y FcγRII.

En las Figuras 25 y 28 se muestra la fagocitosis de eritrocitos mediada por FcγRII y FcγRI, respectivamente, y en comparación con lo mostrado por la microscopia de la fagocitosis a través de CD13 hay una fagocitosis y producción de ROS más intensa; la fluorescencia de igual forma se puede co-localizar en algunos casos con eritrocitos fagocitados, lo cual coincide con lo reportado

anteriormente, el ensamble de la NADPH oxidasa fagocítica mediado por estos receptores está localizado en el fagolisosoma.<sup>12,54</sup>

La microscopia de fluorescencia representó una metodología que permitió observar la localización de las especies reactivas de oxígeno. La totalidad de la célula es fluorescente en las imágenes mostradas; esto puede ser producto de la autofluorescencia de los macrófagos y de la difracción de los rayos producto de observar nuestras muestras a un aumento de 60X en un microscopio invertido. Se esperaba que la fluorescencia estuviera localizada únicamente en las zonas donde se observara un eritrocito; sin embargo, debimos considerar que las ROS son capaces de atravesar membranas y difundir fuera del fagosoma, sumando el hecho de que el H<sub>2</sub>DFF-DA se encuentra internalizado en toda la célula, se puede explicar la fluorescencia en la totalidad de las células.

Se ha demostrado que la fagocitosis a través de FcγRI se incrementa en un 220%, cuando CD13 es coagregado<sup>41</sup> y también que CD13 co-localiza con los receptores I y II para la fracción constante de la IgG.<sup>41,42</sup> Debido a que sólo las moléculas que participan en la fagocitosis se encuentran dentro del fagosoma, la presencia de CD13 en el fagosoma implica una colaboración en la fagocitosis mediada por este receptor. Una vez observado que a la producida de ROS por cada uno de los receptores de forma independiente, se evaluó la fagocitosis y la producción de ROS cuando CD13 es co-agregado con ambos receptores: FcγRI+CD13 y FcγRII+CD13.

En estos experimentos era de nuestro interés conocer el incremento en la producción de ROS con relación a un estímulo no específico (GRFabs). Como ya se había mencionado con anterioridad, la producción de ROS era similar entre CD13 y FcγRII. En la Figura 30 podemos observar que para 5 de los 6 donadores la producción de ROS entre estos receptores es la misma, y la coagregación de los dos receptores no produce un incremento en la producción de ROS. Es claro que algunos receptores fagocíticos como CR3<sup>58</sup>, un receptor para iC3b, no inducen estallido respiratorio y son utilizados por algunos patógenos como receptores de entrada para evitar la actividad microbicida dependiente de oxígeno. CD13 podría tener una producción media de ROS y actuar de forma similar a CR3,

tomando en cuenta que CD13 también es un receptor de entrada para algunos coronavirus enteropatógenos.<sup>39</sup>

Con relación a lo sucedido en presencia de FcγRI observamos que la producción de ROS mediada por este receptor es estadísticamente mayor que la que produce CD13, la interacción de ambos receptores en el mismo sistema no parece modificar la cantidad de ROS producida por el FcγRI (Figura 29). Se menciona que las células tienen una capacidad fagocítica limitada, suponemos que algo similar puede estar ocurriendo con el estallido respiratorio, al ser un proceso enzimático y potencialmente dañino para la célula que lo lleva a cabo, debe ser auto limitado o llegar a un máximo de producción. Por eso, la inducción de ROS por un receptor que genera una intensa producción de estas especies no se ve modificado por la presencia de otro receptor que parece generar estas especies en menores proporciones.

Durante el trabajo observamos que parecía ser necesaria la fagocitosis de una partícula para poder detectar la producción de especies ROS. Existen algunos reportes donde se inhibe la producción de especies reactivas de oxígeno al inhibir el rearreglo del citoesqueleto con citocalasina B<sup>57</sup>, un compuesto también utilizado para inhibir la fagocitosis. Al medir la fagocitosis en condiciones similares a las que se lleva a cabo la medición de ROS (Figura 31), se realizó una normalización de los datos en porcentajes para observar la relación entre la fagocitosis y el estallido respiratorio. Utilizando los valores obtenidos para cuatro donadores, no se pudo llegar a un resultado concluyente, aunque es notorio que estos dos procesos no parecen mostrar una relación lineal, como podría esperarse. De forma cualitativa, puede observarse que para el caso de FcγRI parece existir una dependencia inversamente proporcional, este es el receptor que resulta producir una mayor cantidad de ROS, que podrían estar siendo limitadas en un valor muy alto, por la homeostasis celular. Para el caso de FcγRII y CD13 son productores de ROS medios, los resultados sugieren una dependencia directamente proporcional entre ambos procesos.

Sin embargo, para poder obtener conclusiones más sólidas, es preciso analizar un mayor número de donadores, para determinar si existe algún tipo de

dependencia entre estos dos procesos, o si a pesar de que ambos fisiológicamente ocurren de manera simultánea, son independientes uno del otro.

## 11. CONCLUSIONES

- CD13 es capaz de producir especies reactivas de oxígeno tras la fagocitosis de eritrocitos de carnero.
- CD13 no colabora funcionalmente con FcγRI y FcγRII en la inducción del estallido respiratorio.
- El valor de la producción de ROS de CD13 se encuentra en niveles similares a los que se generan por el estímulo a través de FcγRII.
- En nuestras condiciones experimentales, se requiere de la fagocitosis de una partícula para inducir el estallido respiratorio en macrófagos derivados de monocitos a través de FcγRI, FcγRII y CD13
- El sólo entrecruzamiento de los receptores, FcγRI, FcγRII y CD13, no es suficiente para inducir una producción de ROS diferente del basal.
- La fluorescencia generada por la producción de especies reactivas de oxígeno no pudo ser adecuadamente cuantificada por el citómetro de flujo. La fluorimetría resultó ser un método más adecuado para la medición de especies reactivas de oxígeno en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica.
- Para poder cuantificar mediante DHE la cantidad de anión superóxido generado por el estímulo de los receptores estudiados se requiere de una partícula fagocítica diferente de los eritrocitos, para evitar la interferencia de la hemoglobina.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Werling, D. Hope, J. Howard, C. Jungi, T.(2004) Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology*; **111**: 41-52.
2. Peracchia, M. Barratt, G. Couvreur, P. (2001) Mononuclear phagocytic system. *Encyclopedia of Life Sciences*.
3. Stuart, L. Ezekowits, R. (2005) Phagocytosis: Elegant complexity. *Immunity*; **22**:539-550.
4. Bogdan, C. (2006) Macrophages. *Encyclopedia of Life Sciences*.
5. Abbas, A. Lichtman, A. Pillai, S.(2008) *Inmunología celular y molecular*. 6ta ed. Elsevier. Barcelona, España.
6. Wan, H, Dupasquier, M. (2005) Dendritic Cells *in vivo* and *in vitro*. *Cellular & Molecular Immunology*; **2**: 28-35.
7. Honeyman, MC. Harrison, LC.(2004) *Immunity: Humoral and Cellular*. *Encyclopedia of Life Sciences*.
8. Baldrige, C. Gerard, R. (1932) The extra respiration of phagocytosis. *American Journal of Physiology*; **103**: 235-236.
9. Selvaraj, R.J. and Sbarra, A. J. (1966) Relationship of glycolytic and oxidative metabolism to particle entry and destruction in phagocytosing cells. *Nature (London)* ; **211**, 1272-1276.
10. Forman, H.J. and Torres, M. (2001) Signaling by the respiratory burst in macrophages. *The Journal of International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Life*; **51**: 365-371.
11. Sumimoto, H. (2008) Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *Federation of European Biochemical Societies Journal*; **275**: 3249-3277.
12. Casbon, A. Allen, L.A. Dunn, K.W. and Dinauer, M.C. (2009) Macrophage NADPH oxidase Flavocytochrome *b* localizes to the plasma membrane and Rab11-positive recycling endosomes. *The Journal of Immunology*; **182(4)**: 2325-2339.

13. Williams, H. Griendling, K.K. (2007) NADPH Oxidase inhibitors: New antihypertensive agents? *The Journal of Cardiovascular Pharmacology*; **50**: 9-16.
14. Lin, S.J. Huang, Y. Chen, J. Heyworth, P. Noack, D. Wang, J. Lin, C. Chiang, B. Yang, C. Liu, C. Shieh, C. (2002) Molecular quality control machinery contributes to the leukocyte NADP oxidase deficiency in chronic granulomatous disease. *Biochimica et Biophysica Acta*; **1586**: 275-286.
15. Wardman, P. (2007) Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. *Free Radical Biology and Medicine*; **43**: 996-1022.
16. Sachdev, S. Davies, K. (2008) Production, detection and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology and Medicine*; **44**: 215-223.
17. Bartosz, G. (2006) Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clinica Chimica Acta, International Journal of Clinical Chemistry*; 53-76.
18. Gomes, A. Fernandes, E. Lima, J. (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*; **65**: 45-80.
19. Tarpey, M. Wink, D. Grisham, M. (2004) Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *American Journal Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*; **286**: 431-444.
20. Hempel, S. Buetner, G. O'Malley, Y. Wessels, D. Dawn, F. (1999) Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5( and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology and Medicine*; **27**: 146-159.
21. Soehnlein, O. Kenne, E. Rotzius, P. Eriksson, E. Lindbom, L. (2007) Neutrophil secretion products regulate anti-bacterial activity in monocytes and macrophages. *Clinical and Experimental Immunology*; **151**: 139-145.

22. Basso, C. Smith, I. Sornes, S. Halstensen, A. Lehmann, A. (2000) Concurrent measurement of antigen- and antibody- dependent oxidative burst and phagocytosis in monocytes and neutrophils. *Methods*; **21**: 203-220.
23. Robinson, P. Bruner, L. Basso, C. Hudson, J. Ward, P. Phan, S. (1988) Measurement of intracellular fluorescence of human monocytes relative to oxidative metabolism. *Journal of Leukocyte Biology*; **43**: 304-310.
24. Rothe, G and Valet, G. (1990) Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *Journal of Leukocyte Biology*; **47**: 440-448.
25. Yang, Z. Marshall, J. (2009) Zymosan treatment of mouse mast cells enhances dectin-1 expression and induces dectin-1-dependent reactive oxygen species (ROS) generation. *Immunobiology*; **214**: 321-330.
26. Brubacher, J. Bols, N. (2001) Chemically de-acetylated 2',7'-dichlorohydrofluorescein diacetate as a probe of respiratory burst activity in mononuclear phagocytes. *Journal of Immunological Methods*; **251**: 81-91.
27. Underhill, D. (2003) Toll-like receptors: networking for success. *European Journal of Immunology*; **33**: 1767-1775.
28. Daëron, M. (1997) Fc receptor biology. *Annual Review of Immunology*; **15**: 203-234.
29. Indik, Z. Park, J-G. Hunter, S. Scheriber, A. (1995) The molecular Dissection of Fcγ receptor mediated phagocytosis. *Blood*; **85**: 4389-4399.
30. Boross, P. van de Poel, K. Van de Winkel, J. Leusen, J. (2008) Fc receptors. *Encyclopedia of Life Sciences*.
31. Tay, H. Melendez, A. (2004) FcγRI-triggered generation of arachidonic acid and eicosanoids requires iPLA<sub>2</sub> but not cPLA<sub>2</sub> in human monocytic cells. *The Journal of Biological Chemistry*; **279**: 22505-22513.
32. Melendez, A. Bruestschy, L. Floto, A. Harnett, M. Allen, J. (2001) Functional coupling of FcγRI to nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form) oxidative burst and immune complex trafficking requires the activation of phospholipase D1. *Blood*; **98**: 3421-3428.
33. Park, J. (2003) Phagocytosis induces superoxide formation and apoptosis in macrophage. *Experimental and Molecular Medicine*; **35**: 325-335.

34. VanderVen, B. Yates, R. Russell, D. (2010) Intraphagosomal measurement of the magnitude and duration of the oxidative burst. *Pervasive and Mobile Computing Journal*; **10**: 372-378.
35. Nimmerjahn, F. Ravetch, J. (2008) Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature Immunology*; **8**: 34-45.
36. Takeya, R. Sumimoto, H. (2003) Molecular Mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Molecules and Cells*; **16**: 271-277.
37. Olsen, J. et al. (1997) Structure and expression of aminopeptidase N. *Advances in Experimental Medicine Biology* 421, 47–57
38. Hooper, N. (1994) Families of zinc metalloproteases. *Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology Letters* 354,1–6.
39. Mina-Osorio, P. (2008) The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends in molecular medicine*, **14**: 8; 361-371.
40. MacIntyre, 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. *Journal of Immunology*; **142**: 2377–2383.
41. Mina-Osorio, P. Ortega, E. (2005). Aminopetidase N (CD13) functionally interacts with FcγRs in human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*; **77**: 1008-1017.
42. Riemann, D. Tcherkes, A. Hansen, G. Wulfaenger, J. Blosz, T. Danielsen, M. (2005) Functional co-localization of monocytic aminopeptidase N/CD13 with Fcγ receptors CD32 and CD64. *Biochemical and biophysical research communications*; **331**: 1408-1412.
43. Tokuda, N., Levy, R. (1996) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates phagocytosis but suppresses HLA-DR and CD13 antigen expression in human mononuclear phagocytes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*; **211**: 244 –250.
44. Haraguchi, N. Ishii, H. Mimori, K. Tanaka, F. Ohkuma, M. Kim, H. Akita, H. Takiuchi, D. Hatano, H. Nagano, H. Barnard, G. Doki, Y. Mori, M. (2010) CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cell. *The journal of clinical investigation*; **120**: 3326-3339.

45. Karlsson, A. Nygren, E. Karlsson, J. Nordström, I. Dahlgren, C. And Eriksson, K. (2007) Ability of monocyte-derived dendritic cell to secrete oxygen radicals in response to formyl peptide receptor family agonists compared to that of myeloid and plasmacytoid dendritic cell. *Clinical Vaccine Immunology*; **14**: 328-330.
46. Vulcano, M. Dusi, S. Lissandrini, D. Badolato, R. Mazzi, P. Riboldi, E. Borroni, E. Calleri, A. Donini, M. Plebani, A. Notarangelo, L. Musso, T. and Sozzani, S. (2004) Toll receptor-mediated regulation of NADPH oxidase in human dendritic cells. *The Journal of Immunology*; **173**: 5749-5756.
47. Tan, P. Sagoo, P. Chan, C. Yates, J. Campbell, J. Beutelspacher, S. Foxwell, B. Lombardi, G. and George, A. (2005) Inhibition of NF- $\kappa$ B and oxidative pathways in human dendritic cells by antioxidative vitamins generates regulatory T cells. *The Journal of Immunology*; **174**: 7633-7644.
48. Winnicka, B. O'Connor, C. Schacke, W. Vernier, K. Grant, C. Hall, F. Pereira, F. Liang, B. Kaur, A. Zhao, R. Montrose, D. Rosenberg, D. Aguila, H. Shapiro, L. (2010) CD13 is dispensable for normal hematopoiesis and myeloid cell functions in the mouse. *Journal of Leukocyte Biology*; **88**: 347-359.
49. A. Navarrete Santos, J. Langner, M. Herrmann, D. Riemann (2002) Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. *Cellular Immunology*. **201**;22–32.
50. Beutler, B. (2004) Innate immunity: an overview. *Molecular immunology*; **40**: 845-859.
51. Zhang, J. Tachado, S.D. Patel, N. Zhu, J. Imrich, A. Manfrulli, P. Cushion, M. Kinane, T.B. Koziel, H. (2005) Negative regulatory role of mannose receptors on human alveolar macrophage proinflammatory cytokine release in vitro. *Journal of Leukocyte Biology*; **78** (3): 66-73.
52. Hermosilla, C. Werling, D. (2010) Induction of reactive species in bovine neutrophils is CD11b, but not dectin -1-dependent. *Veterinarian Immunology Immunopathology*.
53. Aguilar-Gaytan, R. Mas-Oliva, J. Oxidative stress impairs endocytosis of the scavenger receptor class A. *Biochemical and Biophysical Research Community* **305** (3): 510-7.

54. Bylund, J. Brown, K.L. Movitz, C. Dahlgren, C. Karlsson, A. (2010) Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: How, where, and what for?. *Free Radical Biology and Medicine*.
55. Papapostolou, I. Patsoukis, N. Georgiou, C. (2004) The fluorescence detection of superoxide radical using hydroethidine could be complicated by the presence of heme proteins. *Analytical Biochemistry*; **332**: 290 -298.
56. Gantner, B. Simmons, R. Canaver, S. Akira, S. Underhill (2003) Collaborative induction of inflammatory responses by Dectin-1 and Toll-like Receptor 2. *The Journal of Experimental Medicine*; **197** (9): 1107-1117.
57. Liu, H. Elwing, H. Karlsson, A. Nimeri, G. Dahlgren, D. (1997) Surface-related triggering of the neutrophil respiratory burst. Characterization of the response induced by IgG adsorbed to hydrophilic and hydrophobic glass surfaces. *Clinical and Experimental Immunology*; **109**: 204-210.
58. Nath, I. (2008). *Immune Mechanisms against Intracellular Pathogens Encyclopedia of Life Sciences*.
59. Zhang, Y. Hoppe, A. Swanson, A. (2010) Coordination of Fc receptor signaling regulates cellular commitment to phagocytosis. *Proceeding of the National Academy of Sciences*; **107**: 19332-19337.