



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**INFLUENCIA DEL NIVEL DE EXPRESIÓN Y/O
ACTIVACIÓN DE LA AMINOPEPTIDASA N (CD13)
EN LA FAGOCITOSIS MEDIADA POR RECEPTORES
Fc γ R EN LÍNEAS CELULARES MONOCÍTICAS
HUMANAS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA
RAYMUNDO ALCÁNTARA DIEGO**

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	Dr. Enrique Ortega Soto
VOCAL:	Dr. Samuel Canizales Quinteros
SECRETARIO:	L.I.B.B. Irma Ileana Licona Limón
1er. SUPLENTE:	Dr. Jose Ignacio Paramo Ramírez
2° SUPLENTE:	Dra. Rocío Gabriela Tirado Mendoza

Esta Tesis se desarrolló en el laboratorio del Dr. Enrique Ortega, del Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Asesora del tema: L.I.B.B. Irma Ileana Licona Limón

Supervisor técnico: Dr. Enrique Ortega Soto

Sustentante: Raymundo Alcántara Diego

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM en el laboratorio del Dr. Enrique Ortega Soto. Fue financiado por los proyectos CONACYT (80301) y DGAPA (IN222008). Agradezco el apoyo técnico de la M. en I.B.B. Claudia A. Garay Canales.

**A mis padres por brindarme siempre apoyo y amor.
A la UNAM por ayudarme a tener una profesión.**

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por tantos motivos que no es posible enumerar.

A mis padres, por su apoyo incondicional en todos sentidos y por el amor que me han manifestado toda la vida.

A mis profesores, por enseñarme el conocimiento académico, y parte del conocimiento personal, que poseo, especialmente al Dr. Ortega y a Ileana Licona quienes han sido mi paciente, principal y adecuada guía en la elaboración de esta tesis.

A la familia de mi madre, por constituir un núcleo cercano de apoyo y cariño que siempre me alienta a seguir.

A mis amigos de la Facultad y vida personal, especialmente a Yudibeth, Berenice y Eduardo, por enseñarme el valor de la amistad en todos sentidos.

Al comité tutorial, por la revisión, corrección y evaluación de mi tesis.

A todos los académicos, estudiantes y personal en general que labora o estudia en las instituciones académicas donde estudié, en especial a los pertenecientes a la Facultad de Química y al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, particularmente a los miembros del laboratorio del Dr. Enrique Ortega: Dra. Isabel, Claudia, Aurora, Irais, Sujhey, Diana, Sergio y Sra. Raquel; por ayudarme en varios sentidos en la elaboración de esta tesis.

A mis compañeros, especialmente a los de la Facultad, por contribuir a resolver dudas y ayudarme en detalles, mostrando la unidad en la profesión que debe siempre prevalecer.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	2
I.-SISTEMA INMUNE.....	2
1.-SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO.....	2
2.-SISTEMA INMUNE INNATO.....	3
2.1.-Componentes y Función.....	3
2.2.- Sistema Fagocítico Mononuclear.....	3
a) Monocitos.....	4
b) Macrófagos.....	5
c) Células Dendríticas.....	6
2.3.- Fagocitosis.....	7
a) Células con Capacidad Fagocítica.....	8
b) Receptores Fagocíticos.....	9
c) Señalización por FcγRs.....	10
c.1) Vías Bioquímicas Activadoras.....	10
c.2) Vías Bioquímicas Inhibidoras.....	12
d) Cierre de la Vacuola Fagocítica.....	13
e) Eventos Posteriores a la Formación del Fagosoma.....	13
II.-RECEPTORES DE LA FRACCIÓN CRISTALIZABLE DE INMUNOGLOBULINA G (FcγRs).....	14
1.-FcγRI.....	15
2.-FcγRII.....	16
2.1.-FcγRIIa.....	16
2.2.-FcγRIIb.....	16
2.3.-FcγRIIc.....	16
3.- FcγRIII.....	17
3.1.-FcγRIIIa.....	17
3.2.-FcγRIIIb.....	17
4.-PARTICIPACIÓN DE FcγRs EN PATOLOGÍAS.....	18
5.-INTERACCIÓN DE FcγRs Y MOLÉCULAS DE SUPERFICIE.....	18
5.1.-Tetraspaninas.....	19
5.2.-SIGLECs.....	19
5.3.-ILTs.....	20
5.4.-SIRPα.....	20
5.5.-Aminopeptidasa N / CD13.....	21
5.6.-Otras moléculas.....	21
III.- LA AMINOPEPTIDASA N (CD13).....	22
1.-CARACTERÍSTICAS.....	22
2.-EXPRESIÓN.....	23
2.1.-Expresión Constitutiva.....	23
2.2.-Expresión en Condiciones Patológicas.....	23
3.-REGULACIÓN.....	24
4.-SUSTRATOS E INHIBIDORES.....	24
5.-FUNCIONES.....	25
5.1.- Funciones Derivadas de su Actividad Enzimática.....	25
a) Regulación de Angiogénesis.....	25
b) Regulación de Factores Vasoactivos.....	25
c) Regulación de Factores Quimiotácticos.....	26
d) Participación en la Motilidad Celular.....	26

e) Procesamiento de Antígenos.....	27
f) Participación en la Proliferación Celular.....	27
5.2.- Funciones Alternas.....	28
a) Molécula de Adhesión.....	28
b) Receptor a Virus.....	28
c) Cristalización y Captura de Colesterol.....	29
d) Fagocitosis.....	29
6.-SEÑALIZACIÓN.....	30
7.-INTERACCIÓN DE CD13 CON FcγRs.....	30
JUSTIFICACIÓN.....	32
HIPÓTESIS.....	34
OBJETIVOS.....	34
I.- OBJETIVO GENERAL.....	34
II.-OBJETIVOS PARTICULARES.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
I.-Células y Anticuerpos.....	35
II.-Análisis de expresión de CD13 y FcγRI por citofluorometría de flujo.....	36
III.-Fagocitosis mediada por FcγRs.....	37
1.-Preparación de las partículas a ser fagocitadas.....	37
2.-Estimulación de CD13 por entrecruzamiento.....	38
3.-Ensayos de fagocitosis mediada por FcγRs.....	38
RESULTADOS y DISCUSION.....	40
I.- Clonación por dilución limitante de las sublíneas L2 y Control.....	40
II.- Efecto de la expresión de CD13 sobre el tiempo de duplicación celular.....	43
III.- Relación entre la expresión de CD13 y FcγRI, y efecto de una menor expresión de CD13 en la fagocitosis por FcγRs.....	45
IV.-Efecto de la estimulación de CD13 sobre la fagocitosis mediada por FcγRs.....	49
CONCLUSIONES.....	54
ANEXOS.....	55
I.-PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS.....	55
1.-Disminución de la expresión de CD13 con ARNsh.....	55
1.1.-Vectores Lentivirales.....	55
1.2.ARNsh.....	57
1.3.-Construcción de las Sublíneas L2 y Control.....	58
2.-Clonación por dilución limitante.....	59
2.1.-Descripción.....	59
2.2.-Obtención de Clonas de las Sublíneas L2 y Control.....	60
II.-IMÁGENES DE CULTIVOS.....	62
III.-ABREVIATURAS.....	63
IV.-ÍNDICE DE FIGURAS.....	65
REFERENCIAS.....	66

RESUMEN

Los monocitos pertenecen al sistema fagocítico mononuclear, el cual forma parte del sistema inmune innato. Los monocitos circulantes migran a tejidos y se diferencian a macrófagos tisulares. Los monocitos y los macrófagos participan en la eliminación de microorganismos patógenos, principalmente a través de la fagocitosis.

El proceso de fagocitosis, en estas células, es mediado por receptores de superficie, entre ellos los FcγRs. Existen reportes que sugieren la regulación de las funciones de FcγRs por otras moléculas de la superficie celular, como tetraspaninas, siglecs, ILTs, SIRPα y CD13, participando como coestimuladoras o coreceptoras.

La aminopeptidasa N (CD13) es una ectometaloproteasa que participa en procesos como angiogénesis, presentación antigénica, quimiotaxis y adhesión. En 2005, Ortega y Mina-Osorio encontraron que CD13 interacciona con los FcγRs regulando positivamente la fagocitosis cuando ambas moléculas son coagregadas por una partícula.

En esta tesis se caracterizó más a detalle la relación entre CD13 y FcγRs. Se encontró que no existe relación entre la expresión en membrana de CD13 y la expresión de FcγRI; que una menor expresión de CD13 no afecta la fagocitosis mediada por FcγRs; y que la estimulación de CD13, por entrecruzamiento con anticuerpos, modula positivamente la fagocitosis mediada por FcγRs.

INTRODUCCIÓN

I.- SISTEMA INMUNE

La función del sistema inmune es la defensa ante microorganismos o sustancias patógenas. Para llevar a cabo esta función el sistema inmune utiliza receptores que reconocen estructuras ajenas, al tiempo que presenta ausencia de reactividad a estructuras propias.

Para su estudio, el sistema inmune puede dividirse en dos ramas: el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo. El sistema inmune innato está encargado de las respuestas tempranas ante un patógeno, ya que sus mecanismos efectores son funcionales antes de una primera exposición; en el sistema inmune adaptativo se agrupan las respuestas tardías y específicas que requieren estimulación y de algún tiempo para iniciar los mecanismos efectores.

El sistema inmune innato es el responsable de estimular la respuesta del sistema inmune adaptativo, y el sistema inmune adaptativo ejerce algunos de sus efectos a través de componentes del sistema inmune innato [1].

1.- SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO

Los principales componentes del sistema inmune adaptativo son los linfocitos T, linfocitos B y productos que secretan los linfocitos B denominados anticuerpos (Ab), de los cuales existen cinco isotipos: IgG, IgA, IgE, IgD e IgM.

Las respuestas del sistema adaptativo se inician por estimulación de receptores clonales, que promueven la proliferación y diferenciación de la clona, permitiendo la formación de mecanismos efectores.

El primer encuentro con el agente patógeno provoca respuestas específicas altamente eficientes, pero que requieren algún tiempo, la exposición subsecuente al agente aumenta la capacidad defensiva de estas respuestas, además se presenta una disminución en el tiempo de esta respuesta. Las principales características de las respuestas adaptativas son diversidad, especificidad, expansión clonal, especialización y memoria [1].

2.-SISTEMA INMUNE INNATO

La respuesta inmune innata es filogenéticamente la más antigua, encontrándose presente desde organismos invertebrados, y representa la primera línea de defensa. Sus mecanismos efectores son funcionales antes de una primera exposición, por lo que las vías efectoras se presentan inmediatamente después de encontrar al agente. El reconocimiento del patógeno está mediado por receptores, codificados en línea germinal, que reconocen estructuras conservadas en patógenos (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos, PAMPs) u opsoninas. Algunos mecanismos innatos, como el procesamiento y presentación antigénica, son indispensables para estimular la respuesta adaptativa [1].

2.1.-Componentes y Función

El sistema inmune innato consiste de barreras epiteliales, factores solubles presentes en secreciones y plasma, células NK, células cebadas, leucocitos polimorfonucleares (PMN) y el sistema fagocítico mononuclear.

Las barreras epiteliales constituyen una barrera física entre el organismo y el agente; los factores solubles como defensinas, complemento, pentraxinas, colectinas, etc., atacan a los microorganismos y/o forman un marcaje para su posterior reconocimiento. Las células NK destruyen células infectadas o dañadas; las células cebadas y los leucocitos PMN (eosinófilos, basófilos, y neutrófilos) secretan productos contenidos en gránulos y fagocitan microorganismos; y el sistema fagocítico mononuclear ejerce su función mediante la fagocitosis de microorganismos, producción de citocinas y presentación de antígenos [1].

2.2.-Sistema Fagocítico Mononuclear.

El sistema fagocítico mononuclear está compuesto por células de linaje hematopoyético mieloide: monoblastos, promonocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas (DCs).

Este sistema está especializado en la fagocitosis de patógenos, proceso que inicia por la unión del patógeno a la célula a través de sus receptores que reconocen estructuras conservadas de patógenos u opsoninas; la fagocitosis

permite la destrucción del patógeno y el posterior procesamiento y presentación antigénicos.

La estimulación de estas células activa factores de transcripción que conducen a la producción de citocinas para regular células de otros tejidos y leucocitos, promoviendo la migración de leucocitos al sitio afectado por inflamación y/o infección, mediante el aumento en la expresión de moléculas de adhesión [1].

a) Monocitos

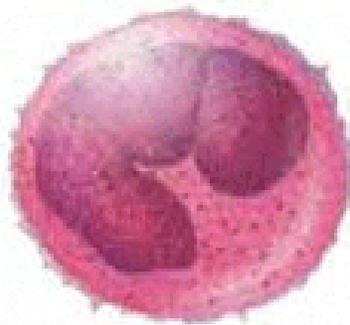


Figura 1: Micrografía de un monocito con su característico núcleo reniforme y citoplasma con gránulos (Obtenida de: <http://citologiaehistologiatm1.blogspot.com>, Diciembre del 2010).

Los monocitos se derivan de células hematopoyéticas pluripotenciales en la médula ósea, bajo la influencia de citocinas la unidad formadora de colonias de monocitos y granulocitos se convierte en monoblasto, posteriormente en promonocito y finalmente en monocito maduro, que ingresa a circulación. Una vez en la circulación los monocitos pueden migrar a tejidos, tanto en condiciones de homeostasis, como en situaciones de inflamación.

Durante su diferenciación en médula ósea, los monocitos adquieren marcadores de superficie de monocitos maduros; por ejemplo, receptores para la fracción constante de IgG (FcγRs), esto les permite unir y fagocitar partículas recubiertas de IgG, lo que constituye una vía de cooperación entre la inmunidad adaptativa e innata.

Los monocitos tienen un diámetro de 10-15µm, poseen núcleos reniformes y citoplasma granular fino, debido a inclusiones como lisosomas y fagosomas (Figura 1), su número en un hemograma normal humano es de ~300,000/mL. Los monocitos maduros pueden fagocitar microorganismos, y secretar citocinas; no

obstante, para ejercer sus funciones óptimamente, requieren diferenciarse en macrófagos ó células dendríticas.

En respuesta a señales quimiotácticas, abundantes durante inflamación, los monocitos se adhieren a receptores de células endoteliales y son extravasados a tejidos, ahí, bajo el microambiente local y por influencia de factores tejido específico, pierden la capacidad de dividirse y se diferencian en macrófagos ó células dendríticas [1].

b) Macrófagos

Los macrófagos tienen un tamaño de 25 a 50 μ m, poseen forma irregular, núcleo excéntrico y aparato de Golgi bien definido, tienen un alto nivel de actividad lisosomal y secretan varias enzimas hidrolíticas como: fosfatasas, lisozima y esterasa inespecífica. Por microscopía electrónica es posible observar vacuolas con material ingerido en diferentes estados de degradación. La principal función de los macrófagos es la fagocitosis y destrucción de microorganismos.

Es posible encontrar macrófagos residentes en todos los tejidos, pero son más abundantes en hígado, bazo, médula ósea y pulmones. Pueden permanecer en los tejidos por meses, antes de morir por apoptosis. Por su localización anatómica, los macrófagos pueden clasificarse en células de Küppfer (hígado), células mesangiales (riñón), macrófagos esplénicos, macrófagos alveolares, macrófagos intersticiales, osteoclastos (huesos), macrófagos peritoneales, macrófagos pleurales, histiocitos (tejido conjuntivo), astrocitos y células de la microglia (SNC). El número de macrófagos en un tejido no es constante, ya que los monocitos pueden ser reclutados por quimiotaxis a sitios de inflamación, donde se diferencian a macrófagos.

Las propiedades de los macrófagos varían en los diferentes tejidos, pero todos tienen una elevada capacidad fagocítica de partículas como bacterias, protozoarios, complejos antígeno-anticuerpo, debris celulares y eritrocitos senescentes. Además de su actividad fagocítica, los macrófagos participan en inmunidad adaptativa como efectores de la actividad tumoricida, microbicida o inflamatoria promovida por los linfocitos T.

Los macrófagos son activados por moléculas de origen bacteriano como endotoxinas, particularmente lipopolisacárido (LPS), o citocinas, como el interferón γ (IFN γ). Cuando los macrófagos son activados cambia su perfil de moléculas de superficie, como el aumento en la expresión de Fc γ Rs, además de comenzar la secreción de citocinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1), derivados del ácido araquidónico (AA.), óxido nítrico, etc., que inician una respuesta inflamatoria, promoviendo el reclutamiento de leucocitos. Existen mecanismos para evitar una exacerbada respuesta de macrófagos que pueda dañar células vecinas. La regulación está mediada, entre otros, por la secreción de citocinas, como el factor transformador del crecimiento β (TGF- β), por linfocitos T reguladores [1].

c) Células Dendríticas (DCs)

Las DCs están ampliamente distribuidas en tejidos linfáticos, epidermis, epitelio de mucosas y parénquima de los órganos. Las DCs poseen grandes prolongaciones de membrana y alta capacidad fagocítica. La principal función de las DCs es la fagocitosis de microorganismos, con el posterior procesamiento y presentación de antígenos a linfocitos T naive, acción que inicia la respuesta adaptativa, es por ello que se les considera células profesionales presentadoras de antígenos (APCs). Algunas de los tipos identificados de DCs son: intersticiales, interdigerentes, foliculares, veliformes, células de Langerhans y plasmacitoides.

Las DCs expresan niveles particularmente elevados de receptores para el reconocimiento de patrones de patógenos, como receptores tipo Toll (TLRs), cuya estimulación conduce a la activación de DCs y receptores para el reconocimiento de opsoninas, como Fc γ Rs, que maximizan su capacidad fagocítica. Expresan también moléculas codificadas en el complejo mayor de histocompatibilidad I y II (MHC-Clase I y MHC-Clase II) a través de las cuales presentan péptidos antigénicos a linfocitos T. Tras su activación, las DCs producen citocinas de perfil pro-inflamatorio como IL-1, IL-6, IL-12 y TNF- α .

Entre los mecanismos que regulan a las DCs está la producción de citocinas anti inflamatorias, como la IL-10, por linfocitos T reguladores y T_h2 [1].

2.3.-Fagocitosis

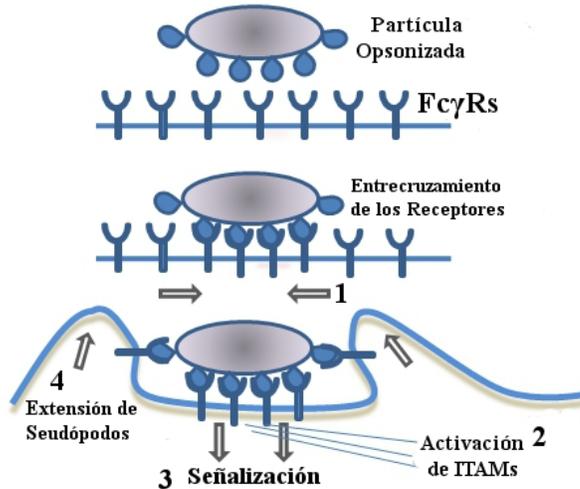


Figura 2: Esquema de la fagocitosis mediada por FcγRs; se muestra el reconocimiento de la partícula opsonizada, que conduce al entrecruzamiento de los FcγRs, activando así los ITAMs presentes en su región citoplásmica, este evento inicia cascadas de señalización que, entre otros efectos, conduce a la extensión de pseudópodos alrededor de la partícula. (Obtenida de: <http://www.ourmed.org/index.php?title=Phagocytosis>)

La fagocitosis consiste en la internalización de partículas superiores a $0.5\mu\text{m}$ por extensiones de membrana citoplásmica denominadas pseudópodos (Figura 2), la fagocitosis termina en la formación de una vesícula intracelular denominada fagosoma, la cual contiene a la partícula ingerida [2].

La fagocitosis consume gran cantidad de ATP, por lo que ocurre de manera óptima en condiciones aeróbicas (tensión $\text{CO}_2 \sim 6\%$), y a una temperatura de 37°C (no se lleva a cabo por debajo de 18°C) [3]. La formación de pseudópodos está dirigida por la polimerización de actina; la citocalasina D, que interfiere con el ensamblaje de actina, impide la fagocitosis [3, 4]. A diferencia de otros mecanismos de internalización, como pinocitosis o endocitosis, la fagocitosis es independiente de clatrina y ubiquitina [5, 6].

La membrana requerida en la formación de pseudópodos y el transporte de algunos componentes de la maquinaria fagocítica requiere de la externalización de endomembranas por exocitosis focal [6, 7]. En cuanto al origen de esta endomembrana existe evidencia de que proviene de endosomas de reciclaje, ya que Rab11, una GTPasa asociada a endosomas de reciclaje, aparece en la membrana citoplásmica durante la fagocitosis [8]. Además, en macrófagos con una quimera de proteína verde fluorescente (GFP) unida a VAMP3, en células en

reposito VAMP3-GFP se localiza en endosomas de reciclaje, pero es conducida a la copa fagocítica durante la fagocitosis [9].

El modelo de cierre describe que la asociación entre receptores del fagocito y la superficie de la partícula provocan que la membrana se deslice alrededor de la partícula hasta englobarla, dando lugar a un fagosoma estrecho de mínimo volumen luminal [6]. En contraste, el modelo de la ola describe que una elevación extensiva de la membrana del fagocito, iniciada a alguna distancia de la bacteria, envuelve una considerable cantidad de fluido junto con la bacteria, dando lugar a un fagosoma espacioso, dada la falta de relación espacial estricta entre la bacteria y el movimiento de la membrana, frecuentemente resulta en un proceso abortivo o forma macropinosomas vacíos [7].

La redistribución, durante la fagocitosis, de moléculas de membrana citoplásmica a la copa fagocítica, es un proceso altamente controlado, donde algunas moléculas resultan selectivamente excluidas [10], como ocurre con la integrina VLA4 y Thy,1 en células cebadas de mucosas [11], o las moléculas del MHC Tipo I y II, en monocitos [12]; mientras que otras moléculas, que participan en la fagocitosis, son reclutadas, como VAMP7, en macrófagos, que participa en la exocitosis focal [13]; CD11b/CD18, en macrófagos, que al ser una molécula de adhesión aumenta la unión partículas, particularmente las opsonizadas con C3b [14]; o la kinesina 5b, en macrófagos, necesaria para la exocitosis de membrana y receptores [15].

La posterior maduración del fagosoma permite la destrucción del patógeno, y el procesamiento y presentación de antígenos.

a) Células con Capacidad Fagocítica

La fagocitosis es efectuada desde organismos unicelulares hasta células de organismos superiores. Fue descrita por primera vez por Metchnikoff en 1908, tras observar macrófagos fagocitando restos de plantas o esporas de hongos, esto le llevó a pensar que la fagocitosis era un mecanismo de defensa de los organismos. En los mamíferos los tipos celulares de mayor capacidad fagocítica son neutrófilos, monocitos, macrófagos y DCs [16].

b) Receptores Fagocíticos

En células humanas, los receptores que median fagocitosis pueden clasificarse en dos grupos:

El primero de estos grupos reconoce estructuras ajenas, como los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), cuyos ligandos son moléculas altamente conservadas en microorganismos, entre éstos se encuentran receptores a manosa, fucosa y β -glucano; en este grupo se encuentran también los receptores “scavenger”, que reconocen lipoproteínas modificadas, LPS y ácido lipoteicoico (LTA).

El segundo grupo de receptores reconoce ligandos propios, denominados opsoninas, que se unen a la superficie de patógenos facilitando su reconocimiento y fagocitosis. Los más importantes de estos receptores son receptores para proteínas del complemento, CR1, CR4 y CR3, cuyos ligandos son C3b y C3bi [11], y los receptores para la fracción constante de los anticuerpos (FcRs): IgA (Fc α Rs), IgE (Fc ϵ Rs) e IgG (Fc γ Rs) [17, 18].

Dado que los patógenos presentan diversos ligandos en su superficie, y además pueden ser opsonizados, es probable que *in vivo* activen simultáneamente múltiples receptores fagocíticos de las células fagocíticas, como receptores para manosa, receptores “scavenger”, receptores para proteínas del complemento y Fc γ Rs, lo que asegura un adecuado nivel de fagocitosis del microorganismo, que permita controlar el proceso infeccioso [19].

El entrecruzamiento de los receptores Fc γ R activa cascadas de señalización que conducen a diversas respuestas, como la producción de citocinas, fagocitosis, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), etc. [5]. Estas vías de señalización están relativamente bien estudiadas en los Fc γ Rs, y se describen abajo [2]. De la fagocitosis mediada por otros receptores se conoce menos y es campo actual de investigación; no obstante, las cascadas de señalización inducidas por la mayoría de los receptores fagocíticos ha demostrado poseer múltiples moléculas en común con la señalización por Fc γ Rs, como la activación de las cinasas Syk y PI3-K, por lo que se considera el modelo de estudio de este tipo de receptores [5, 20].

c) Señalización por FcγRs

c.1) Vías bioquímicas activadoras

La fagocitosis mediada por FcγRs se inicia por entrecruzamiento de estos receptores con partículas recubiertas con IgG (Figura 3), lo que induce la activación de una cinasa de la familia Src, la cual fosforila las tirosinas que forman parte del motivo de activación basado en tirosina (ITAM), en la porción citoplásmica de FcγRs [3, 5, 21].

La fosforilación de los ITAMs por Src [5, 21, 22], los convierte en sitios de unión para los dominios SH-2 de la cinasa Syk. La unión de Syk permite su fosforilación por la cinasa Src, lo que induce su activación [3, 5, 21]. La activación de Syk resulta fundamental para la fagocitosis, ya que se ha demostrado que el uso de inhibidores de Syk, el silenciamiento de su expresión o la delección del gen, impide la fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG [23-27].

Syk induce la activación de varias enzimas, como la fosfatidil-inositol 3 cinasa (PI3-K), fosfolipasa Cγ (PLCγ), fosfolipasa D (PLD), proteína cinasa C (PKC) y GTPasas de la familia Rho [5]. La PI3-K transforma el fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PI-3,4-P2) en fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), lo que promueve el reclutamiento a la membrana plasmática de moléculas con dominios PH [28], además PI3-K es capaz de activar algunas isoformas de PKC [29]. El uso de inhibidores de PI3-K bloquea la fagocitosis de partículas grandes [3] y la aparición de marcadores de endomembrana en la superficie [9, 30, 31]. También provoca acumulación de vesículas en citoplasma, sugiriendo que se bloquea la exocitosis focal [3].

La PLCγ hidroliza el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2), formando IP₃ y diacilglicerol (DAG) [5, 32]. El IP₃ libera Ca²⁺ de pozas intracelulares, y el DAG activa algunas isoformas de PKC [33]; además aumenta la permeabilidad membranal a Ca²⁺ [34].

La PLD transforma la fosfatidilcolina en colina y ácido fosfatídico (PA) [5], el PA es transformado en DAG por la fosfatasa-1 del ácido fosfatídico (PAP-1), constituyendo una vía de activación para PKC [33]. La inhibición de la PLD, en neutrófilos, disminuye la fagocitosis [35].

La familia PKC esta formada por cinasas de treonina/serina [36], que participan en la activación de ERK [7]; PKC también activa a PLA-2. El uso de inhibidores de PKC o la expresión de isoformas inactivas, reduce la fagocitosis [37, 38].

GTPasas como Rho, Cdc42 y Rac, regulan la formación de fibras de actina [39]. Cdc42 y Rac activan a PAK1, la cual se acumula en la copa fagocítica [40], donde fosforila a LIMK [41]. LIMK fosforila a cofilina [42] bloqueando su actividad depolimerizante de actina [43]. La inhibición de Rho, Cdc42 y Rac bloquea el ensamblaje de actina, y la internalización de inmunocomplejos [38, 39].

La cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) es activada por PKC o PI3-K [26, 44]. ERK activa a PLA-2 [45], y participa en la activación de factores de transcripción que aumentan la producción de citocinas.

Existen 3 isoformas de fosfolipasa A2 (PLA-2) en leucocitos, una forma secretada dependiente de Ca^{2+} , una citoplásmica dependiente de Ca^{2+} (cPLA-2), y una citoplásmica independiente de Ca^{2+} (iPLA-2) [33, 46], cPLA-2 está regulada por ERK y MAPK [47], e iPLA-2 por PKC [37]. PLA-2 produce AA a partir de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina [33]; el AA producido regula la exocitosis focal [48].

En cuanto al Ca^{2+} , existen células capaces de llevar a cabo fagocitosis Ca^{2+} dependiente y Ca^{2+} independiente [49, 50]. El Ca^{2+} activa la gelosina, que se une a los filamentos de actina impidiendo su elongación [34].

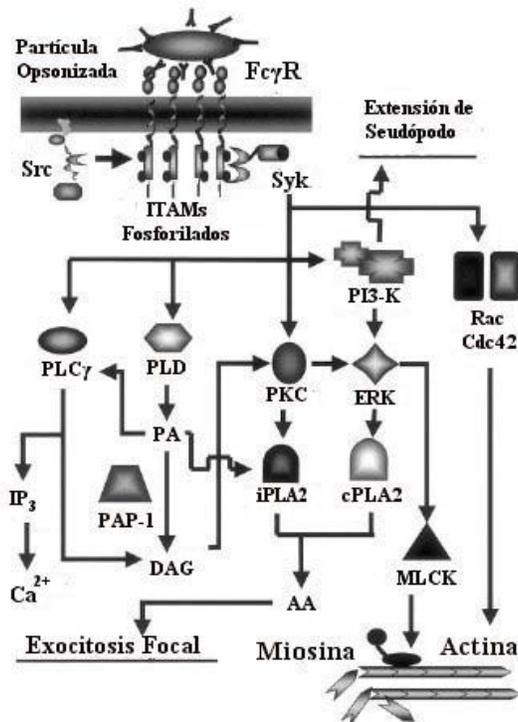


Figura 3: Diagrama de la señalización inducida en la fagocitosis por FcγRs (Modificado de García-García y Rosales [5])

c.2) Vías bioquímicas inhibitoras

La señalización que inhibe la activación por ITAMs, se inicia por el entrecruzamiento conjunto (coagregación), de receptores con motivos de inhibición basados en tirosina (ITIMs) con los receptores con ITAMs, esto permite que el ITIM sea fosforilado por Src [51]. La fosforilación de los ITIMs por Src [5, 21, 22], los convierte en sitios de unión a dominios SH-2, como los de las fosfatasas SHIP-1, SHIP-2, SHP-1 y SHP-2 [51-53], que una vez activadas defosforilan moléculas, cuya activación es crítica en señalización activadora [21].

SHIP-1 interfiere con la señalización mediada por PI3-K, ya que hidroliza PIP3 e IP₄ [51], impidiendo el reclutamiento de moléculas con dominios PH, como PKC, PLD y PLCγ (Figura 4) [51, 54, 55]. SHP-1 y SHP-2 hidrolizan PIP3 interfiriendo, al igual que SHIPs, con el reclutamiento de moléculas con dominios PH [51, 53].

La unión selectiva de SHIPs ó SHPs al ITIM, esta dado por aa. hidrófobos en la posición Y+2 del ITIM [56], y por el nivel de fosforilación [57]. Tanto SHPs como SHIPs son reclutados también por ITAMs, aunque con menor afinidad [51].

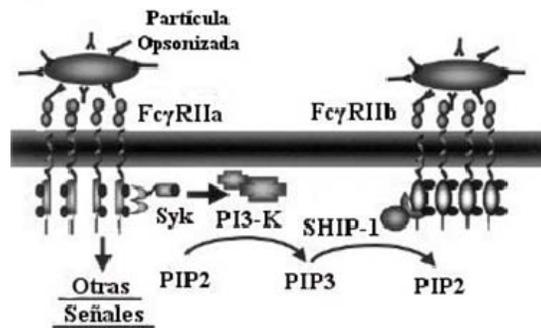


Figura 4: Diagrama de la señalización inhibidora del FcγRIIb vía SHIP-1, SHIP-1 transforma PIP3 en PIP2, interrumpiendo la señalización activadora de FcγRIIa (Modificado de García-García y Rosales [5]).

d) Cierre de la vacuola fagocítica

Para terminar la fagocitosis, la copa fagocítica debe cerrarse alrededor de la partícula, en este proceso participan los receptores de la proteína soluble de anclaje NSF (SNAREs), que regulan la especificidad de la fusión intermembranal mediante la formación de complejos entre v-SNAREs de la vesícula, y t-SNAREs en la membrana blanco [4-6, 58].

También se ha propuesto la participación de miosinas, proteínas motoras con actividad de ATPasa, como las miosinas IC, II, V y IXb, que son reclutadas a la copa fagocítica, como las responsables de proveer la fuerza contráctil que permite el cierre de la membrana alrededor de la partícula [59].

e) Eventos posteriores a la formación del fagosoma

El fagosoma se mueve al interior de la célula mientras sufre una extensa y rápida remodelación por eventos de fusión y fisión con vesículas, la más importante, para la destrucción de los microorganismos, es la fusión con el lisosoma. En este proceso de maduración, el fagosoma intercambia moléculas asociadas a su membrana, como proteínas y PIs [4, 5, 20].

Durante la maduración del fagosoma ocurren procesos como producción de especies reactivas de oxígeno (dependiente de NADPH oxidasa) y nitrógeno, lo que es conocido como estallido respiratorio; acidificación, debido a la presencia de bombas de protones en su membrana, lo cual activa enzimas como la mieloperoxidasa e hidrolasas; y producción de iones haluros, por la fusión con el

lisosoma [4, 60]. Estos procesos destruyen al microorganismo y permiten el procesamiento y presentación antigénica. Las cinéticas del fagosoma son variables y dependen de las propiedades de la partícula como su naturaleza química e hidrofobicidad [61].

II.- RECEPTORES DE LA FRACCIÓN CONSTANTE DE INMUNOGLOBULINAS G (FcγRs)

Los FcγRs, pertenecen a la familia de receptores de reconocimiento inmune multcadena (MIRRs). Son glicoproteínas que reconocen la fracción cristalizable (Fc) de inmunoglobulinas G (IgG) (Figura 5). En los humanos se encuentran codificados por 8 genes, se han descrito 3 clases y 13 isoformas generadas por splicing alterativo [3, 52, 62].

Las 3 clases descritas de FcγRs son: FcγRI/CD64 de alta afinidad, que reconoce principalmente anticuerpos monoméricos, FcγRII/CD32 y FcγRIII/CD16 de baja afinidad, que reconocen anticuerpos agregados. Los FcγRs son expresados por la mayoría de los leucocitos, particularmente por monocitos [3, 52]. El entrecruzamiento de estos receptores con partículas opsonizadas con IgG o inmunocomplejos conteniendo IgG, resulta en la estimulación de vías bioquímicas que conducen a funciones como fagocitosis, ADCC, citólisis y secreción de citocinas [52].

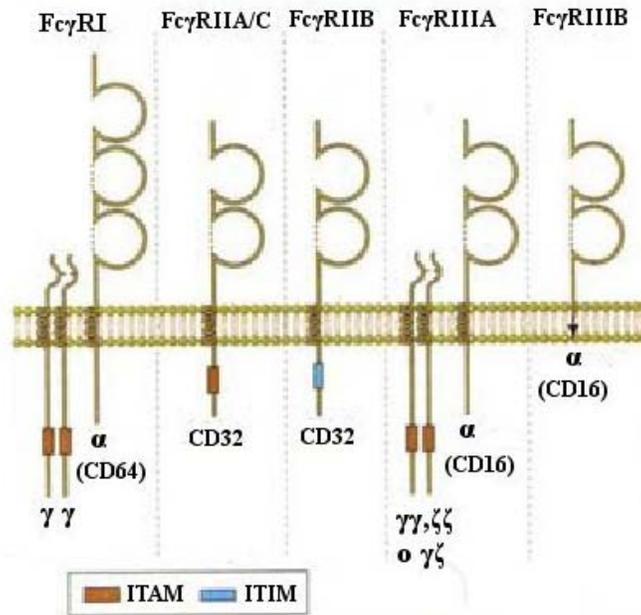


Figura 5: Esquema de la estructura de los FcγRs, se muestran las cadenas α de unión al Fc, y las cadenas de señalización γ y ζ; también se muestran en anaranjado los ITAMs y en azul el ITIM. (Modificado de Abbas y Lichtman, *Inmunología Celular y Molecular*, 6^{ta} Edición, 2008)

1.- FcγRI

El FcγRI es una proteína de 72KDa expresada por monocitos, macrófagos, células dendríticas, líneas mieloides como: U-937, HL-60 y THP-1, y por neutrófilos estimulados con IFN-γ y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) [62]. El FcγRI es capaz de mediar procesos como: estallido respiratorio, ADCC, fagocitosis y producción de citocinas, además la fagocitosis mediada por FcγRI favorece la presentación antigénica.

El gen que codifica al FcγRI esta en el *locus* 1q21.1. El FcγRI se expresa como un complejo hetero-oligomérico con la cadena α de unión a ligando y 2 cadenas de señalización γ, que contienen ITAMs [3, 51].

FcγRI se une a IgG con alta afinidad ($K_a \approx 10^7$ a 10^8Lmol^{-1}), con afinidad $\text{IgG3} > \text{IgG1} > \text{IgG4}$. Su expresión puede ser aumentada por estimulación con IFN-γ, G-CSF e IL-10; y disminuida por la IL-4 e IL-13 [63]. La expresión del FcγRI aumenta bajo algunas condiciones pro-inflamatorias, por ejemplo, la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), y la artritis reumatoide [63, 64].

El entrecruzamiento de la cadena α del FcγRI, estimula la señalización activadora, iniciada por los ITAMs de las cadenas γ, como se indicó anteriormente.

2.- FcγRII

El FcγRII, una glicoproteína de 40KDa, es el más ampliamente distribuido de los FcγRs. El FcγRII reconoce IgG complejada o polimérica con baja afinidad ($K_a < 10^7 \text{Lmol}^{-1}$) [63]. Se conocen 3 subclases: FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIIc, cuyos genes están en el *locus* 1q23-24 [3, 22, 52].

2.1.- FcγRIIa

El FcγRIIa es expresado en monocitos, macrófagos, células de Langerhans, PMN, plaquetas, células endoteliales de placenta y linfocitos T [3, 51]. El FcγRIIa es capaz de mediar procesos como estallido respiratorio, degranulación, ADCC, fagocitosis y producción de citocinas, además la fagocitosis mediada por el FcγRIIa favorece la presentación antigénica.

El FcγRIIa tiene su ITAM en la porción citoplásmica de la cadena α ; no obstante, en monocitos y macrófagos la cadena α puede interactuar con la cadena γ para señalizar [3, 51]. El entrecruzamiento del FcγRIIa inicia señales activadoras, como se describió anteriormente.

2.2.- FcγRIIb

El FcγRIIb es la única isoforma inhibidora, ya que posee un ITIM en la región citoplásmica de la cadena α . El FcγRIIb es expresado en macrófagos, DCs basófilos, células cebadas y linfocitos B. Reconoce isotipos de IgG con afinidad $\text{IgG3} > \text{IgG1} > \text{IgG4}$. El FcγRIIb inhibe la activación de linfocitos B, DCs, células cebadas y fagocitos mononucleares [52, 53, 63].

El entrecruzamiento de FcγRIIb con partículas recubiertas de IgG, inicia señalización inhibidora a través del ITIM en su dominio citoplásmico, como se describió anteriormente [51].

2.3.- FcγRIIc

El FcγRIIc es expresado por células NK, y es, probablemente, resultado de una recombinación entre los genes de las isoformas *IIA* y *IIB*, codificando una proteína que semeja al FcγRIIa en su porción citoplásmica, y al FcγRIIb en su porción extracelular, es por ello que presenta la misma afinidad por isotipos de IgG

que el FcγRIIb, pero su entrecruzamiento conduce, como el FcγRIIa, a señalización activadora [65, 66].

3.- FcγRIII

El FcγRIII es una glicoproteína de 50-80KDa (presenta diferente patrón de glicosilación en células mieloides que en linfocitos), se conocen dos subtipos; el FcγRIIIa y el FcγRIIIb; codificadas por genes homólogos, en el *locus* 1q23-24 [51].

La expresión y función del FcγRIII depende de su asociación con la cadena γ y en monocitos y macrófagos, y de su asociación con las cadenas γ y ζ en células NK. La expresión del FcγRIII puede ser aumentada por el TGF-β, y disminuida por la IL-4 [51].

3.1.- FcγRIIIa

El FcγRIIIa es expresado por células NK, macrófagos, y algunos subtipos de linfocitos T, donde puede mediar ADCC, estallido respiratorio, flujos de Ca²⁺, apoptosis, degranulación, producción de citocinas y fagocitosis. El FcγRIIIa se expresa como un complejo hetero-oligomérico con la cadena α de unión a ligando y cadenas de señalización γ y ζ, que contienen ITAMs. El FcγRIIIa reconoce IgG con baja afinidad ($K_a \sim 3 \cdot 10^7 \text{Lmol}^{-1}$) [3, 51, 52, 62, 65].

El entrecruzamiento de la cadena α del FcγRIIIa, estimula la señalización activadora, iniciada por los ITAMs de las cadenas γ y/o ζ, como se indicó anteriormente.

3.2.-FcγRIIIb

El FcγRIIIb reconoce IgG con baja afinidad ($K_a < 10^7 \text{Lmol}^{-1}$) [63], es expresado exclusivamente en neutrófilos. La cadena α está anclada a membrana por una porción glicosilfosfatidilinositol (GPI). Carece de dominios transmembranal y citoplásmico [63], por lo que se cree que no posee capacidad de señalización; no obstante, se ha reportado que su entrecruzamiento puede activar cinasas de tirosina de la familia Src, y a las cinasas p38MAPK y ERK [51, 52], por lo que se

postula que se asocia con moléculas capaces de señalar como CR3, BCR o el FcγRIIIa [3, 51, 67].

4.-PARTICIPACIÓN DE FcγRs EN PATOLOGÍAS

La presencia de polimorfismos en isoformas de FcγRs, como en el FcγRIIIa o FcγRIIIb, constituyen factores de riesgo a enfermedades infecciosas como meningitis y periodontitis, reacciones transfusionales y a enfermedades autoinmunes como neutropenias y lupus eritematoso sistémico [63, 64, 68].

Por otro lado, el nivel de expresión de isoformas de FcγRs participa en cuadros autoinmunes, por ejemplo; niveles disminuidos de FcγRIIIb correlacionan con la aparición de patologías autoinmunes [52, 53, 65, 69].

5.-INTERACCIÓN DE FcγRs CON OTRAS MOLÉCULAS DE SUPERFICIE

Las funciones de los FcγRs pueden ser moduladas por moléculas de la membrana citoplásmica (reguladoras de señalización), fenómeno ampliamente descrito para otros miembros de la familia de MIRRs como BCR y TCR [70], donde moléculas que participan como coestimuladoras o coreceptoras regulan la señalización e incluso la naturaleza de la respuesta (Figura 6) [71].

Estructura		Interacciones:
	Tetraspaninas	FcγRII-CD9 FcεRI-CD8 FcγRII-CD151 FcγRIII y FcγRI-CD82 FcεRI-CD81
	SIGLECS (Sialic-acid binding lectins)	FcγRI-CD33 FcγRI-MIS
	SIRPs (Signal Regulatory Proteins)	FcεRI-SIRPα FcγRs-SIRPα
	ILTs (Immunoglobulin-like transcripts)	FcγRIII-ILT3 FcεRI-ILT4 and ILT5 FcγRII-ILT4 and ILT2 FcRγchain-ILTs?
	CD13 (Aminopeptidasa N)	FcγRI-CD13

Figura 6: Estructuras propuestas de moléculas de superficie que se han reportado capaces de interactuar en señalización por FcγRs. (Modificado de Mina-Osorio y Ortega [71])

5.1.- Tetraspaninas

Las tetraspaninas son una familia de proteínas expresadas virtualmente en toda célula humana [72], capaces de interactuar con otras moléculas; se les ha implicado en la formación, estabilización y función de complejos proteicos de membrana [73]. Carecen de elementos de señalización, sugiriendo que su función es regular en tiempo y espacio la señalización de moléculas de membrana.

El uso de anticuerpos monoclonales (mAbs) que reconocen a la tetraspanina CD9, provocando su entrecruzamiento, es capaz de inducir funciones como formación de dendritas en neuronas [74], agregación de células pre-B y activación de linfocitos T [71], lo anterior resulta congruente con la participación de CD9 en eventos de señalización. En la activación de plaquetas inducida con algunos mAbs anti CD9, se propone la participación del FcγRII, ya que el uso de mAb anti FcγRII bloquea el efecto, y además no puede inducirse utilizando F(ab')₂, es decir al retirar el ligando de FcγRs; no obstante, la activación de plaquetas a través de FcγRII es bioquímicamente diferente [75].

Del mismo modo, se ha reportado la posible asociación de otras tetraspaninas como CD151, CD82 y CD81, con FcγRs, en funciones como agregación, liberación de mediadores y flujos de Ca²⁺. La interacción de estas tetraspaninas y FcγRs se sugiere ya que los efectos se observaron al utilizar mAbs, los cuales reconocen a la tetraspanina por sus Fabs, mientras que a través de sus Fc pueden actuar como ligandos de FcγRs. La participación de FcγRs, también resulta congruente con que estos efectos no pudieron inducirse utilizando F(ab')₂; es decir, al retirar el ligando de FcγRs; los efectos se inhibieron con el uso de mAbs anti FcγRs, lo que impide la coagregación de ambas moléculas por los mAbs dirigidos a las tetraspaninas; y además se presentó variación del efecto en función del isotipo de IgG, lo que altera por afinidad la participación de FcγRs [76-78].

5.2.-SIGLECs

Las lectinas similares a inmunoglobulinas de unión a ácido siálico (Siglecs) son expresadas preponderantemente en células hematopoyéticas; la mayoría de

Siglecs poseen un ITIM. Se ha reportado que la coestimulación en monocitos del Siglec-3 (CD33) y del FcγRI, inhibe la movilización de Ca²⁺ inducida por FcγRI, mediante el reclutamiento de SHP-1 y SHP-2 [79].

Otro Siglec capaz de interactuar con FcγRs es el inhibidor mieloide de ratón (MIS), el cual posee dos ITIMs, se ha descrito que al ser coagregado con FcγRI, disminuye la movilización de Ca²⁺ inducida por este último [80].

El papel funcional de estas interacciones, parece ser que dada la ausencia de ácido siálico en la mayoría de patógenos, los Siglecs previenen la activación de mecanismos microbicidas contra células propias [81].

5.3.- ILTs

Existen reportes de la interacción de FcγRs con transcritos similares a inmunoglobulina (ILTs), de los cuales algunos poseen un ITIM [82].

En macrófagos, la coestimulación de ILT3 y FcγRIII inhibe la señalización de Ca²⁺ mediada por FcγRIII; este mismo efecto se presenta también en células mielomonocíticas por el entrecruzamiento de ILT4 ó ILT2 y FcγRII [83-85]. En contraposición, otros ILTs como ILT1, ILT6a, ILT7 e ILT8, inducen señales activadoras, lo cual, se postula, es mediado por asociación con la cadena γ de FcγRs [86].

5.4.- SIRPα

Las SIRPs constituyen una familia de glicoproteínas transmembranales con dominios extracelulares tipo inmunoglobulina, presentes en células NK y en la mayoría de células mieloides. Los SIRPs poseen la capacidad de señalizar por la presencia de ITIMs en la región intracelular de algunos miembros de la familia, o por la asociación con proteínas adaptadoras que poseen un ITAM [87].

La estimulación en macrófagos de SIRPα, un SIRP con ITIM en su región citoplásmica, por su ligando CD47, una molécula ampliamente expresada en eritrocitos, resulta en la inhibición de fagocitosis por CRs y FcγRs, presumiblemente por activación de la vía de SHPs [88].

Se ha propuesto que la función de esta interacción es regular la eritrofagocitosis, previniendo el desarrollo de anemia hemolítica, y regular la fagocitosis de microorganismos, ya que al igual que el mecanismo de Siglecs, la ausencia de ligandos de SIRP α en una célula favorecen su fagocitosis [71].

5.5.- Aminopeptidasa N / CD13

La interacción de Fc γ Rs con CD13, fue propuesta porque se logró inducir movilización de Ca²⁺ en monocitos utilizando mAbs dirigidos contra CD13, lo que no pudo repetirse con F(ab')₂; es decir, al retirar el ligando de Fc γ Rs, y varió en función del isotipo de mAb utilizado [89].

5.6.- Otras Moléculas

La movilización de Ca²⁺ inducida por estimulación de CD36, β 2 microglobulina, CD41, CD14, moléculas del MHC-I y II y CD35, mediante su entrecruzamiento con mAbs, no puede repetirse con fracciones F(ab')₂, puede inhibirse por adición de mAb anti Fc γ Rs [90, 91], y el efecto varía en función del isotipo de mAb utilizado [89]; todo lo anterior sugiere la participación de Fc γ Rs.

Existen reportes de modulación positiva, por la estimulación de otras moléculas, de los efectos mediados por Fc γ Rs; por ejemplo, la estimulación previa de TLR7 y TLR8 aumenta la producción de citocinas y ADCC mediada por Fc γ Rs [92]. Además, en macrófagos la estimulación de TLR4 con LPS aumenta la capacidad fagocítica por Fc γ Rs [93]. También se ha reportado, en macrófagos, que la estimulación del receptor BTL-1 con leucotrieno B4 aumenta la capacidad fagocítica por Fc γ Rs [94].

Existen también reportes de que la estimulación de otras moléculas modula negativamente los efectos mediados por Fc γ Rs; por ejemplo, la coagregación de la fosfatasa CD45 con Fc γ RI ó Fc γ RIIa provoca un aumento en la producción de IL-6, y pérdida de la fosforilación en tirosina de proteínas, la movilización de Ca²⁺ y la polimerización de actina, mediada por Fc γ Rs [95-97]; el entrecruzamiento de la fosfatasa CD148 con Fc γ RIIa provoca la pérdida de la fosforilación de proteínas, pero no la pérdida de la movilización de Ca²⁺, mediada por Fc γ RIIa, lo que

además indica que la activación de las fosfatasas CD148 y CD45 conduce a la inactivación de diferentes moléculas, activadas en la señalización del FcγRIIa [98].

III.- AMINOPEPTIDASA N (CD13)

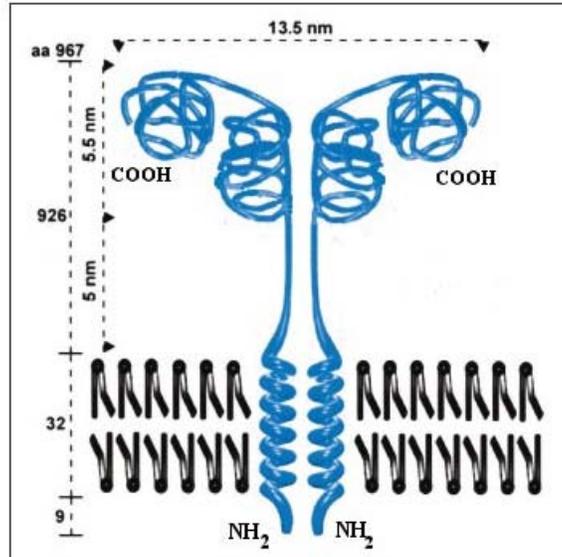


Figura 7: Representación esquemática de un homodímero de Aminopeptidasa N (CD13), mostrando el número de aa. en sus porciones extracelular, transmembranal y citoplásmica; su dimensión aproximada en nanómetros; y la localización de sus extremos amino (NH₂) y carboxilo (COOH). (Modificado de Riemann y Kehlen [99])

La aminopeptidasa N (APN ó CD13) (Figura 7) es un ectoenzima ampliamente expresada, a la que se le atribuyen diferentes funciones aparte de su actividad enzimática, como la capacidad de inducir endocitosis o capacidad de señalización.

1.- CARACTERÍSTICAS

CD13 es una gluzincina de la familia M1, de la superfamilia de metaloexopeptidasas, caracterizadas por la secuencia consenso HEXXH y el motivo de ácido glutámico GXMEN [100]. En el humano el gen que codifica a CD13 está en el *locus* 15q25-26, con un tamaño de 35Kb y comprende 20 exones [99, 101].

Se expresa como homodímero de 160KDa, la dimerización ocurre en el retículo endoplásmico por unión entre los dominios VII de cada monómero, previo a la glicosilación, con ~400 azúcares en 10 sitios del extremo N-terminal, llevado a

cabo en el Aparato de Golgi. Se ha reportado la existencia de isoformas con diferentes patrones de glicosilación (glicofomas) [102].

CD13 posee una región extracelular de 926 aa., una región transmembranal de 30aa., y una región citoplásmica, carente de motivos de señalización, de 8-10 aa. donde se localiza su extremo N-terminal. El sitio de unión al sustrato se localiza próximo al extremo C-terminal, mientras que su sitio catalítico se localiza cerca del extremo N-terminal [99].

La actividad catalítica de CD13, consiste en remover aminoácidos no sustituidos del extremo N-terminal de péptidos con cadenas laterales preferentemente neutras (afinidad: Ala>Phe>Tyr>Leu>Arg>Thr>Trp>Lys>Ser>Asp>His>Val), el enlace precedido por un prolina es resistente a la actividad de CD13; su actividad óptima se da a pH 7 [99, 103].

Existe una forma soluble de CD13 (sCD13), de concentración en suero humano ~4.6nM [104]. El sCD13 bloquea la adhesión celular inducida por algunos mAbs anti CD13; sCD13 presenta una mayor concentración en sitios de inflamación [103], y en fluido intratumoral, donde contribuye al proceso de angiogénesis [105].

2.-EXPRESIÓN

2.1.-Expresión Constitutiva

CD13 es expresada en sistema nervioso, placenta, microvellosidades del riñón e intestino, etc. En el tejido hematopoyético, bajo condiciones normales, es expresada por células pluripotenciales, precursores de linfocitos T y B, y células precursoras y maduras de linaje mieloide [106].

2.2.-Expresión en Condiciones Patológicas

Es expresada en linfocitos T de líquido sinovial de pacientes con artritis [107] o esclerosis múltiple, fluido pericárdico de pacientes con cirugía para reemplazo valvular o en linfocitos tumorales infiltrantes, especialmente en carcinomas renales, por esta razón es utilizado como un marcador en el diagnóstico de algunas neoplasias malignas [99].

CD13 es sobreexpresado en melanomas [108], cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer gástrico[109], leucemia mieloide crónica y aguda [110]; en estos casos se ha asociado a una mayor invasividad tumoral [111-113], en algunas leucemias se ha relacionado con resistencia a apoptosis. El uso de inhibidores de CD13, como la bestatina, abate la resistencia de estas leucemias a la apoptosis [114], y aumenta la sensibilidad de células de cáncer cervical a la radiación [115]; en contraste, CD13 presenta una expresión disminuida en cáncer prostático [116].

3.-REGULACIÓN

La regulación de CD13 se efectúa a nivel de síntesis, degradación o inhibición endógena. Las citocinas IL-4 e IFN- γ regulan positivamente el nivel de transcripción y síntesis de CD13 en monocitos, macrófagos, células endoteliales y células del epitelio tubular renal [117, 118].

En células epiteliales, CD13 cuenta con un promotor tipo caja TATA río arriba del codón de inicio; mientras que en células mieloides y fibroblastos posee un promotor de sitios múltiples, localizados en un exón 8Kb río arriba del codón de inicio; los dos promotores difieren en cuanto al sitio de unión de factores de transcripción, aún cuando la proteína codificada es estructuralmente idéntica [99].

4.- SUTRATOS E INHIBIDORES

Entre los sustratos de CD13 se encuentran: péptidos vasoactivos (lisil-bradicinina, angiotensina I y III), hormonas neuropeptídicas (leu- y met- encefalina, neurocinina A, somatostatina, esplenopentina y nociceptina), citocinas y péptidos inmunomoduladores (interleucinas 6 y 8 [119], tuftsina, timopentina), glutatión y hemorfinas (derivadas de la hemoglobina similares en su extremo N terminal a la angiotensina IV); participa de la degradación de proteínas de matriz extracelular como entactina y colágeno IV [99, 113].

Algunos de sus inhibidores son o-fenantrolina, EDTA, actinonina, amastatina, probestina, bestatina, febestina, curcumina, leuhistina, bradicinina, puromicina, ácido betulínico, β -amino-tioles, α -aminofosfonatos, derivados del ácido flavona-8-

acético como el ácido 2',3-dinitroflavona-8-acético, sustancia P, y algunos mAbs [99].

5.-FUNCIONES

5.1.- Funciones Dependientes de su Actividad Enzimática

a) Regulación de la Angiogénesis

CD13 regula la angiogénesis mediante degradación de proteínas de matriz extracelular, asociación con la galectina 3 de células endoteliales [120], conversión de angiotensina I en II (la cual exhibe efectos vasoconstrictores [121] y proangiogénicos), y activación de citocinas proangiogénicas como IL-6 e IL-8 [122].

La hipoxia y el uso de factores angiogénicos induce la expresión de CD13 en células endoteliales [92]. El uso de inhibidores de CD13 o ausencia de CD13 conduce al bloqueo de la neovascularización retinal inducida por hipoxia y disminución de la respuesta a factores de crecimiento inductores de angiogénesis [123]. Se ha reportado también la inhibición de angiogénesis inducida por el Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2 (FGF-2), utilizando inhibidores de CD13 en vascularidad de polluelos [122].

El uso de inhibidores de CD13 como bestatina, amastatina, así como algunos mAbs anti CD13, es capaz de abrogar la habilidad de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs) cultivadas en Matrigel® de organizar una red capilar, sin alterar su tasa de proliferación [124].

CD13 es sobreexpresado en algunos tipos de cáncer, como pulmonar, renal, de mama, cervical[109], donde se postula media la angiogénesis tumoral, como lo sugiere el aumento en la invasividad en este tipo de neoplasias [111-113], esto ha propiciado la exploración del uso de inhibidores de CD13, como la bestatina, en el tratamiento de cáncer pulmonar [125], cervical [126] y hepático [127].

b) Regulación de Factores Vasoactivos

Se ha propuesto que CD13 participa en la regulación de la presión arterial; por ejemplo, experimentos en ratones encontraron que la administración intracerebrovascular de sCD13 reduce la presión arterial, mientras que la

administración, por esta misma vía, de inhibidores de CD13 aumenta la presión arterial. Además la disminución de la actividad de CD13 a nivel del sistema nervioso central se ha relacionado con el desarrollo de hipertensión en ratas espontáneamente hipertensas [128]. La función antihipertensiva de CD13 se cree mediada por su actividad sobre angiotensina III al convertirla en angiotensina IV, ya que la angiotensina III promueve la secreción de vasopresina [129], la cual es capaz de aumentar la presión arterial.

c) Regulación de Factores Quimiotácticos

Existe evidencia del papel de CD13 en la promoción de quimiotaxis, como lo indica la sobreexpresión de CD13 y aumento en su actividad en macrófagos alveolares, que provoca la infiltración de linfocitos T del fluido broncoalveolar [130]; de manera similar el aumento en la actividad de CD13 causa alveolitis linfocítica tras la irradiación torácica en ratas [131]. El aumento en la actividad de CD13 también provoca la infiltración linfocítica de fluido sinovial en pacientes con artritis reumatoide [99, 122]. La participación de CD13 en quimiotaxis se atribuye a que el entrecruzamiento de CD13 promueve la secreción de la quimiocina CXCL8, además de activarla por corte enzimático [132].

En contraposición, CD13 podría participar de manera negativa en la quimiotaxis como lo sugiere el aumento en la respuesta quimiotáctica de neutrófilos a MCP-1 y MIP- α , luego de la adición de inhibidores de CD13 como actinonina o bestatina [122, 133]. La función de CD13 en la regulación negativa de la quimiotaxis se atribuye a su capacidad de degradar a la quimiocina CXCL11[134], y al receptor para quimiocinas CXCR4 [135].

d) Participación en la Motilidad Celular

CD13 participa en la motilidad celular, como se ha reportado en células tumorales de pulmón CL1-0, al inducir la expresión de CD13 o incubar con sCD13, lo que aumenta su capacidad migratoria en Matrigel®; además, el uso de mAbs anti CD13 inhibe la migración de estas células en este mismo ensayo [136].

También se ha observado que la transfección de células neoplásicas metastáticas con ARNsh para el ARNm de CD13, o el uso de inhibidores de CD13, bloquea la migración de estas células en Matrigel® y su motilidad en ensayos de daño por herida [137].

Adicionalmente, CD13 participa en la motilidad espermática, ya que el porcentaje de espermatozoides inmóviles es inversamente proporcional a la actividad de CD13 en líquido seminal [138]. El papel de CD13 en motilidad espermática se atribuye a la activación enzimática de citocinas y encefalinas [139].

Por otro lado, células que expresan una variante enzimáticamente inactiva de CD13 aumentan su capacidad migratoria, aun cuando no en la medida que aquellas que expresan la forma enzimáticamente activa, sugiriendo que la actividad enzimática de CD13 no es el único mecanismo por el que CD13 participa en la motilidad celular [137].

e) Procesamiento de Antígenos

El CD13 participa en el procesamiento antigénico, como lo indica la capacidad de CD13 de escindir péptidos que protruyen de moléculas del MHC Tipo II [140]; además, CD13 es capaz de degradar péptidos sintéticos tipo I en DCs [141].

Adicionalmente, la preincubación de DCs con mAbs anti CD13 resulta en inhibición de la proliferación de los linfocitos T incubados con estas DCs, atribuible a una menor estimulación del TCR de linfocitos T, a través de los antígenos presentados en las moléculas del MHC de las DCs [142].

f) Participación en la Proliferación Celular

El CD13 participa en la proliferación de algunos tipos de células; por ejemplo, el uso de inhibidores de CD13 disminuye la proliferación de líneas celulares de coriocarcinoma, leucemia, linfoma y mieloma [143-146].

Además, células hematopoyéticas tumorales que expresan una secuencia anti sentido del mRNA de CD13 poseen tasas de proliferación más bajas que células portadoras de la secuencia sentido del mRNA de CD13 [143-147].

La disminución en la proliferación, inducida por bestatina, de la línea promonocítica U-937, resulta reversible, congruente con que la administración de bestatina aumenta, después de algún tiempo, la expresión de CD13 [148].

5.2.- Funciones Alternas

a) Molécula de adhesión

Se propone la participación de CD13 como molécula de adhesión, ya que en células de melanoma la mayoría de las moléculas de CD13 se redistribuyen a las zonas de contacto célula-célula [99]. También se ha reportado que CD13 se distribuye de manera homogénea en la membrana de células aisladas, pero al formar agregados se desplaza a las zonas de contacto célula-célula, contacto que además induce la expresión de CD13 [108].

El entrecruzamiento de CD13 en monocitos humanos induce agregación homotípica (HA), proceso en el cual CD13 se asocia a galectina-3, la adición de anticuerpos anti-galectina 3 elimina la HA inducida por CD13, sugiriendo que la galectina 3 es el ligando de CD13 al actuar como molécula de adhesión [149]. No obstante, el CD13 de monocitos como el de células endoteliales se localiza en los mismos complejos durante la adhesión, lo anterior sugiere que, como alternativa a la galectina 3, el mismo CD13, de diferentes células, puede fungir como su ligando durante la adhesión [150].

b) Receptor viral

Se ha reportado que la adición de mAbs contra CD13 a fibroblastos de pulmón humano, inhibe la infección y además impide la unión del citomegalovirus humano, indicando que CD13 es utilizado como receptor en la infección de fibroblastos por este virus [151]. Además, CD13 puede fungir como receptor para el coronavirus humano 229E, causante de infecciones del tracto respiratorio superior, al interactuar con los residuos 288 y 295 [152]; y para otros coronavirus del tipo TGEV (causante de gastroenteritis) [153], en cuya unión participan los residuos 717 y 813 del extremo C-terminal de CD13 [154]. La participación de

CD13 en infecciones virales se atribuye a su capacidad de mediar endocitosis, ya que este es el mecanismo de entrada de coronavirus y del citomegalovirus [155].

c) Cristalización y Captura del Colesterol

Parece ser que CD13 participa en la cristalización del colesterol, ya que al aislar vesículas biliares de pacientes con cálculos de colesterol, se encontró una proteína de 130KDa, posteriormente tipificada como CD13 [156], capaz de promover la cristalización del colesterol *in vitro* [157, 158].

Además, CD13 es la mayor proteína de unión a concanavalina A y las proteínas unidas a concanavalina A son los principales agentes en la cristalización de colesterol [156]; no obstante, la participación de promotores de la cristalización de colesterol no es crucial en la formación de cálculos, por lo que la utilidad de CD13 se limitaría a procedimientos diagnósticos.

Por otro lado, CD13 también podría participar en la captura de colesterol, ya que la unión de Ezetimibe, un inhibidor de la absorción de colesterol, al CD13 de la superficie de eritrocitos es suficiente para que se presente el efecto del fármaco[159], lo que indica que CD13 es la molécula blanco y por tanto que CD13 participa en la captura y absorción del colesterol.

El uso de análogos de Ezetimibe no afecta la actividad enzimática de CD13, por lo que se cree que Ezetimibe afecta la asociación de CD13 con balsas de lípidos ("lipid rafts"), induciendo la internalización de CD13; o disminuyendo la expresión de proteínas asociadas a balsas de lípidos como CD36 o FcγRs, y/o interrumpe la asociación de CD13 con CD36 ó FcγRs, mediante inducción de un cambio conformacional, afectando la estabilidad de la unión de CD13 a balsas de lípidos, lo que entonces disminuye la cantidad de CD13 presente en la membrana citoplásmica [160].

d) Fagocitosis

Existen reportes de la participación de CD13 en fagocitosis, por ejemplo, se presenta correlación entre la expresión de CD13 y la fagocitosis de carboxil-microesferas por monocitos de sangre periférica, donde las células de mayor

capacidad fagocítica expresan el doble de CD13 respecto de las células menos fagocíticas, además la estimulación de estas células con 1,25-dihidroxitamina D3, que incrementa la capacidad fagocítica, disminuye la expresión de CD13 en células poco fagocíticas pero no en las altamente fagocíticas, mientras que la estimulación de estas células con prostaglandina E2 (PGE2), otro promotor de la actividad fagocítica, aumenta la expresión de CD13 en células altamente fagocíticas [161].

La participación de CD13 en la fagocitosis podría ser la de un receptor fagocítico, ya que células monocíticas son capaces de fagocitar partículas que interactúan vía CD13 [162]; en un entorno *in vivo* el ligando de CD13 para inducir fagocitosis podrían ser moléculas del patógeno, como la ya reportada unión a la toxina Cry1A(c) de *Bacillus thuringiensis*; o moléculas que funcionen como opsoninas, como la Galectina-4 [103, 163].

6.- SEÑALIZACIÓN

La estimulación de monocitos con mAb anti CD13 conduce a un aumento en los niveles de Ca^{2+} citoplásmico, provoca la fosforilación de las MAPK: ERK1, ERK2, JNK y p38; y además aumenta los niveles del ARNm de IL-8, los efectos inducidos pueden bloquearse con inhibidores de cinasas de tirosina o de PI3-K.

La señalización mediada por CD13, a pesar de no poseer motivos de señalización, sugirieren la participación de proteínas auxiliares de membrana, en este sentido se han propuesto a la galectina 3, galectina 4, a la proteína rica en cisteína inductora de reversión con motivos Kazal (RECK), al antígeno asociado a tumores L6, y a los FcγRs [132].

7.- INTERACCIÓN DE FcγRs CON CD13

La cooperación entre CD13 y los FcγRs fue sugerida por primera vez por MacIntyre et al. en 1989, quienes propusieron que el aumento de Ca^{2+} intracelular en la línea monocítica humana U-937 inducida con mAbs anti CD13, podría ser atribuido a la formación de complejos de membrana entre CD13 y FcγRs. La participación de FcγRs se propuso luego de que este efecto no pudo ser repetido

con las fracciones $F(ab')_2$ del mAb y que la magnitud del efecto varió en función del isotipo de anticuerpo utilizado [89].

En 2005, Ortega y Mina-Osorio efectuando experimentos en monocitos de sangre periférica y células U-937, encontraron que durante la fagocitosis mediada por FcγRs se presenta redistribución de CD13 hacia la copa fagocítica y su posterior internalización en los fagosomas. Encontraron también que se presenta redistribución parcial de CD13 hacia zonas polarizadas de la membrana por agregación del FcγRI con mAb, y al efectuar el experimento opuesto se presenta una casi completa redistribución de FcγRI hacia las zonas de agregación de CD13 [162], lo anterior sugirió la participación de CD13 en la fagocitosis por FcγRs.

Posteriormente encontraron que, en este mismo tipo de células, se presenta un nivel mayor de fagocitosis de eritrocitos tratados para interactuar vía CD13 y FcγRI, respecto de la fagocitosis de eritrocitos que interactúan solo a través del FcγRI (aumento promedio del 220%) [162]. Estos datos indican la cooperación de CD13 y FcγRI en la fagocitosis.

Además encontraron que, en estas células, la interacción de partículas únicamente a través de CD13 es capaz de inducir fagocitosis [162], sugiriendo entonces que el aumento en la fagocitosis, por estimulación simultánea con partículas que interactúan con CD13 y FcγRI, podría atribuirse a la cooperación como receptores fagocíticos.

Por otro lado, observaron aumento en el tiempo de fosforilación de Syk (fundamental en señalización de FcγRs), tras la estimulación de CD13 y FcγRI, respecto de la estimulación solo por el FcγRI [162]; sugiriendo que el aumento en la fagocitosis por estimulación simultánea con partículas que interactúan con ambas moléculas, podría deberse a la modulación por CD13 de la señalización fagocítica del FcγRI.

JUSTIFICACIÓN

El trabajo desarrollado en la presente tesis se enfocó a analizar algunos aspectos de la relación funcional entre CD13 y FcγRs.

En primer lugar, se propuso investigar si existe una relación entre los niveles de expresión de CD13 y de FcγRI, ya que su asociación funcional en el proceso de fagocitosis [162], podría reflejarse en coregulación de su expresión, como ocurre con algunas moléculas que participan de un mismo proceso como: PKD1L3 y PKD2L1 en la percepción del sabor [164]; el antígeno de tumores metastáticos-1 (MTA-1) y la transglutaminasa 2, en el proceso inflamatorio [165]; CD80 y CD86, en la presentación antigénica [166]; TLR-2 y TLR-6 en el reconocimiento de PAMPs [167]; y como el mismo CD13, CD86 y moléculas del MHC II, en el procesamiento y presentación antigénica [168].

También se propuso investigar el efecto de una menor expresión de CD13 sobre la fagocitosis mediada por FcγRs, ya que la relación funcional de estas moléculas en la fagocitosis [162], podría implicar la necesidad de contar con un nivel basal de expresión de CD13 para una adecuada fagocitosis por FcγRs.

Se investigó también el efecto de la estimulación de CD13, por entrecruzamiento con anticuerpos, sobre la fagocitosis mediada por FcγRs. Se sabe que el entrecruzamiento de un receptor con anticuerpos es capaz de estimular la señalización mediada por este receptor [169-173]. Ejemplos de esto son trabajos en que se ha estimulado al receptor DR5 con un mAb, lo cual conduce a apoptosis en células de líneas neoplásicas; este efecto es aún mayor al entrecruzar el mAb con un anticuerpo secundario [173]. Efectos similares se observaron en la estimulación de la molécula Thy-1 en linfocitos T, con un mAb que modula positivamente la señalización del TCR/CD3 en la fosforilación de proteínas, flujos de Ca^{2+} , y producción de IL-2 [172]; y en la estimulación de las integrinas $\alpha 4$ o $\beta 1$ con mAbs, que conduce a disminución en la proliferación celular de células formadoras de colonias [171].

Al no interactuar la partícula a ser fagocitada con la célula vía CD13, se imposibilita la participación de CD13 como receptor fagocítico, y al estimular a CD13 por entrecruzamiento, se favorecería su participación en eventos de

señalización. De esta manera el experimento permitiría determinar si el aumento en la fagocitosis de partículas que interactúan vía CD13 y FcγRI respecto de partículas que interactúan por FcγRI[162], se debía a la suma de las fagocitosis mediadas por FcγRI y CD13; o bien, si el aumento se debía a la modulación positiva de la señalización de FcγRI por CD13, como ocurre por estimulación de las tetraspaninas CD151, CD82 y CD81[71], o en la estimulación del receptor BTL-1 con leucotrieno B4[94].

La relevancia de estudiar la relación de CD13 y FcγRs en la fagocitosis, es el aumentar el conocimiento de la regulación de la fagocitosis, proceso crucial en infecciones y patologías autoinmunes, por lo que su mejor comprensión resulta útil a la diagnóstica y terapéutica.

HIPÓTESIS

El nivel de expresión y/o activación de la Aminopeptidasa N (CD13), es capaz de afectar la eficiencia de la fagocitosis mediada por receptores FcγR en monocitos humanos.

OBJETIVOS

I.- OBJETIVO GENERAL

-Determinar si el nivel de expresión ó activación de CD13, modula la fagocitosis mediada por receptores FcγR en la línea celular monocítica humana THP-1.

II.- OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Determinar si existe una correlación entre el nivel de expresión de CD13 y del receptor FcγRI en células THP-1.
- b) Determinar si existe una correlación entre el nivel de expresión de CD13 y la fagocitosis mediada por receptores FcγR.
- c) Determinar si la estimulación de CD13 en células THP-1, modula la fagocitosis mediada por receptores FcγR.
- d) Determinar si una menor expresión de CD13 y del receptor FcγRI, afecta la tasa de proliferación de células THP-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

I.-CÉLULAS Y ANTICUERPOS

La línea celular promonocítica THP-1 fue obtenida del American Type Cell Culture Collection (ATCC, Rockville MD.). La sublínea L2 fue generada por transducción de células THP-1 con el vector lentiviral NM-001150 (Sigma, St. Louis MO.) que contenía secuencias codificantes de ARNsh para el ARNm de CD13. La sublínea Control fue generada por transducción de células THP-1 con un vector lentiviral que contenía secuencias codificantes de ARNsh para el ARNm de proteína verde fluorescente (GFP), construido a partir del plásmido PLKO.1 puro. Las clonas L2-F8, L2-G3 y L2-G6, se obtuvieron por dilución limitante de la sublínea L2; y la clona C-B7, se obtuvo por dilución limitante de la sublínea Control (ver anexos: procedimientos complementarios).

Todas estas líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Sigma,) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB; Invitrogen, Grand Island, N.Y.), piruvato de sodio 1mM (Gibco, Grand Island N.Y.), disolución de aminoácidos no esenciales 2mM (Gibco), L-glutamina 0.1mM (Gibco), penicilina 100U/mL (Gibco) y estreptomina 100µg/mL (Gibco).

Los cultivos se mantuvieron a 37° C en atmósfera húmeda con 6% de CO₂, en densidades poblacionales de 80,000cél./mL a 1,000,000cél./mL. Para todos los experimentos se utilizaron células provenientes de cultivos con una densidad poblacional de ~580,000 cél./mL (densidades poblacionales cercanas a 500,000 cél./mL evitan variaciones en expresión de FcγRs[174]).

El mAb murino anti FcγRI (clona 32.2 isotipo IgG1 (ATCC)) fué purificado del sobrenadante del hibridoma correspondiente, mediante el paso por columna de agarosa acoplada a proteína G (Invitrogen). El mAb murino anti CD13 humano clona 452 isotipo IgG1, fue igualmente purificado, a partir del sobrenadante del hibridoma, gentilmente donado por el Dr. Meenhardn Herlyn del Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, PA. La producción de los fragmentos F(ab')₂ del mAb 452 mediante digestión con Ficina inmovilizada en Agarosa (Pierce Rockford, IL), y su posterior purificación en columna de agarosa acoplada a

proteína A (Invitrogen), se efectuaron de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

El anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón, sin fluorocromo, fue adquirido de Sigma, St. Louis MO., el anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína fue adquirido de Zymed, San Francisco CA. Los anticuerpos policlonales (pAbs) de conejo anti DNP fueron obtenidos por purificación en columna agarosa-proteína G (Invitrogen), del suero de un conejo inmunizado con DNP-ovoalbúmina.

II.-ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CD13 Y FcγRI POR CITOFUOROMETRÍA

Células (500,000) del cultivo de la línea THP-1 o de las clonas L2-F8, L2-G3, L2-G6, se lavaron 3 veces en buffer de citometría de flujo (PBS pH 7.5, con 2% de SFB y 0.02% Azida de Na). Los lavados se realizaron por centrifugación a 1500rpm, 5min. El botón de células fue resuspendido en 200μL de buffer de citometría de flujo, al cual se adicionaron 10 μg de mAb 452 ó 10μg de mAb 32.2 (anticuerpos primarios), y se incubaron en hielo por 30 minutos. Las células se lavaron 3 veces en buffer de citometría de flujo.

El botón de células fue resuspendido en 200μL de una dilución de 1:300 del anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón acoplado a FITC (anticuerpo secundario) en buffer de citometría de flujo, las muestras se incubaron 35 minutos en hielo. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces en buffer de citometría de flujo, el botón obtenido se resuspendió en 150μL de disolución fijadora para citofluorometría de flujo (PBS pH 7.5 con 1.5% de paraformaldehído PFA).

Como controles de cada experimento se dejó una muestra sin anticuerpos y otra muestra a la que únicamente se adicionó anticuerpo secundario. Las muestras fueron adquiridas en el canal FL1 del citofluorómetro de flujo FACS Calibur (BD, San José, CA.). Los datos obtenidos de la adquisición fueron analizados mediante el software Cell Quest Pro (BD), para obtener un histograma de cuenta total de células en función del logaritmo de la fluorescencia de FITC.

En los experimentos en donde se realizó una curva de unión a CD13 por las distintas concentraciones de fragmentos F(ab')₂ 452 (0.01µg, 0.1µg, 1µg y 10µg) se utilizó la metodología de tinción antes descrita.

III.- FAGOCITOSIS MEDIADA POR FcγRs

1.- PREPARACIÓN DE PARTÍCULAS A SER FAGOCITADAS

Se tomó una alícuota de 600µL de eritrocitos de carnero desfibrinados (Erikar, México D.F.) en disolución de Alsever (0.11M dextrosa, 0.07M NaCl, 0.03M de Citrato de Sodio, 2.6mM de ácido cítrico, pH 6.2). Los eritrocitos se lavaron 6 veces (2 pulsos de centrifugación, centrífuga Eppendorf de mesa 5415C) con 1mL de PBS con BSA 0.1%).

Se tomaron 1200×10^6 eritrocitos de carnero en 8mL de PBS con BSA 0.1%, se les adicionó 30µL de Carboxi-fluorescein Succinimidil éster 10mM (CFSE, Invitrogen, Eugene, Oregon), y se incubaron a 37° C por 25 minutos, para marcarlos. El proceso de tinción fue detenido por la adición de 2.25mL de SFB y 2.7mL de PBS con BSA 0.1%; incubando 20 minutos a 37° C. Posteriormente, los eritrocitos se lavaron 2 veces con 7mL de PBS con BSA 0.1% (centrifugación 3600 rpm, 3 minutos), 1 vez con 3.5mL de PBS con BSA 0.1% y 3.5mL de buffer de Boratos (0.2M de ácido bórico, 0.15M de NaCl, pH 8.5) y 2 veces con 7mL de buffer de Boratos. El botón de eritrocitos marcados (1200 millones) se resuspendió en 7mL de buffer de Boratos, y se dividió en dos fracciones de 3.5mL cada una. Cada tubo se llevo a 7mL con buffer de Boratos y se adicionaron 0.0031g de ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS; Eastman, Rochester N.Y.). Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad. Se adicionaron 7mL de buffer de Boratos a cada tubo, y se lavó una vez con 4mL de buffer de Boratos y 4mL de DGVB (0.25g de gelatina por cada 500mL, 1.25mM de barbital, 69.4mM de dextrosa, 35.9mM de NaCl, 1.5×10^{-4} mM de CaCl₂, 5×10^{-4} mM de MgCl₂, pH 7.5), y dos veces más con 7mL de DGVB. El botón fue resuspendido en 1mL de DGVB, y almacenado a 4° C toda la noche.

Al día siguiente, se lavó el botón de eritrocitos sensibilizados, 1 vez con 1mL de DGVB. Una de las dos alícuotas se resuspendió en 300µL de DGVB

(eritrocitos TNBS). La otra alícuota se resuspendió en 1mL de DGVB y se le adicionó 0.6µg de pAbs de conejo anti DNP (eritrocitos opsonizados), se incubó en hielo en oscuridad por 35 minutos. La suspensión de eritrocitos opsonizados se lavó 7 veces con 1mL de DGVB, y se resuspendió en 300µL de DGVB.

2.- ESTIMULACIÓN DE CD13 POR ENTRECruzAMIENTO (ensayos de fagocitosis por FcγRs con estimulación por CD13)

Nota: La adición de estos anticuerpos se llevó a cabo en tubos que contenían células para 2 ó 3 reacciones (1×10^6 ó 1.5×10^6 respectivamente), los volúmenes señalados en esta metodología son por cada 500,000 células).

A las muestras de 500,000 células THP-1 se les efectuaron 2 lavados con 200µL de RPMI suplementado (5 minutos a 2000rpm en centrífuga Eppendorf de mesa 5415C), se resuspendió a los botones en 200µL de RPMI suplementado, se les adicionaron diferentes cantidades de fragmentos F(ab')₂ del mAb 452 (0µg, 0.01µg, 0.1µg, 1µg y 10µg), y se colocaron las muestras en incubación en hielo por 30 minutos.

El exceso de fragmentos F(ab')₂ del mAb 452 fue retirado por 2 lavados con 200µL de RPMI. Los botones se resuspendieron en 200µL de RPMI, después de lo cual se tomaba 200µL, de los tubos con células para 3 reacciones, para efectuar la curva de unión a CD13 por los fragmentos F(ab')₂ del mAb 452.

Se adicionó a cada muestra la misma cantidad, respecto de los fragmentos F(ab')₂ del mAb 452, de pAbs de cabra anti IgG de ratón, y se colocaron las muestras en incubación en hielo por 35 minutos, para inducir entrecruzamiento. Posteriormente se lavaron 3 veces con 200µL de RPMI, tras lo cual los botones se resuspendieron en 200µL de RPMI. Al final del proceso de estimulación de CD13, por entrecruzamiento con anticuerpos, se dividió a las alícuotas en fracciones de 500,000 células contenidas en 200µL de RPMI.

3. ENSAYOS DE FAGOCITOSIS MEDIADA POR FcγRs

Células (500,000) del cultivo THP-1 o de las clonas L2-F8, L2-G3, L2-G6, se lavaron con 1mL de RPMI (5 minutos a 2000rpm en centrífuga Eppendorf 5415C), resuspendiendo los botones en 200µL de RPMI.

Nota: En el caso de los ensayos de fagocitosis con estimulación de CD13, se continuó a partir de este punto.

Se adicionaron 10×10^6 eritrocitos de la suspensión de eritrocitos TNBS a dos series de muestras. Se adicionaron 10×10^6 eritrocitos de la suspensión de eritrocitos opsonizados a dos series de muestras. Se colocó una serie de muestras con eritrocitos TNBS y una serie de muestras con eritrocitos opsonizados en incubación en hielo y atmósfera ambiente, mientras que una serie de muestras con eritrocitos TNBS y una serie de muestras con eritrocitos opsonizados se incubaron a 37°C y $6\% \text{CO}_2$; en todos los casos por 2 horas y 30 minutos. Se centrifugaron las muestras 5 minutos a 2000rpm, los botones fueron resuspendidos en $900\mu\text{L}$ de agua bidestilada, se permitió la lisis de los eritrocitos no fagocitados por 90 segundos, se adicionaron $100\mu\text{L}$ de PBS 10X pH 7.5, se centrifugaron. Se lavaron los botones con 1mL PBS. Se resuspendió a los botones en $150\mu\text{L}$ de disolución fijadora para citofluorometría de flujo.

Las muestras fueron adquiridas en el canal FL1 citofluorómetro de flujo FACSCalibur (BD). Los datos obtenidos de la adquisición fueron analizados mediante el software Cell Quest Pro (BD), para obtener gráficas tipo densidad poblacional de tamaño celular en función de la fluorescencia de CFSE, sobre las cuales se estableció una división en cuadrantes, separando la población celular en baja y alta fluorescencia, posteriormente se solicitó al programa la información estadística de los cuadrantes.

RESULTADOS y DISCUSION

I.- CLONACIÓN POR DILUCIÓN LIMITANTE DE LAS SUBLÍNEAS L2 Y CONTROL

En trabajos previos en este laboratorio, se produjo una sublínea con menor expresión de CD13 respecto de la línea THP-1, la cual se designó como L2. Esta sublínea se produjo mediante transducción de células THP-1 con un vector lentiviral (ver anexos, procedimientos complementarios).

La expresión de CD13 en la sublínea L2, determinada por citofluorometría de flujo, presenta una distribución normal (Figura 8), con una población con expresión de CD13 prácticamente nula (Figura 8, barra A) que se sobrelapa con las curvas de las células sin teñir; y otras dos poblaciones con expresiones baja intermedia (Figura 8, barra B) y baja alta (Figura 8, barra C) de CD13.

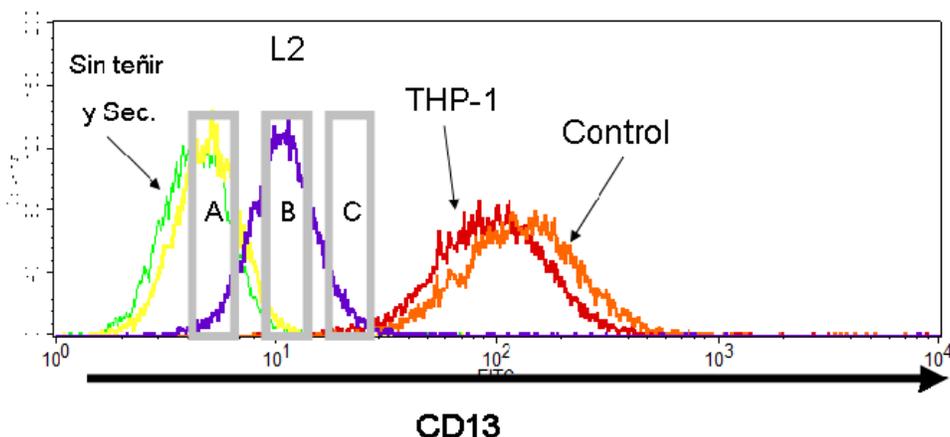


Figura 8: Histogramas superpuestos de cantidad de eventos (células), en función del logaritmo de la intensidad de fluorescencia (FITC), se observa la distribución normal en la expresión de CD13 en la línea THP-1, y sublíneas L2 y Control. Se indica en las barras A, B y C, los diferentes perfiles de baja expresión de CD13, que se deseaban obtener a partir de la sublínea L2.

Como una estrategia para aislar las poblaciones con diferentes niveles de expresión de CD13, y así estudiar la relación entre la expresión de CD13 y FcγRs, y las implicaciones de una menor expresión de CD13 para la fagocitosis por FcγRs, se realizó clonación por dilución limitante, esta misma metodología se efectuó simultáneamente en la sublínea Control (ver anexos, procedimientos complementarios).

Se sembraron 100µL de una suspensión de células de la sublínea L2 ó Control en placas de 96 pozos a una densidad de 100, 10 ó 1 células/mL, después de 14 días, se seleccionaron aleatoriamente 12 clonas, y se cuantificó el nivel de expresión de CD13 por citofluorometría de flujo.

Las 12 clonas L2 seleccionadas presentaron, en seis experimentos independientes, un nivel de expresión de CD13 similar al de la sublínea L2 parental (datos no mostrados).

Posteriormente, se seleccionaron aleatoriamente 8 clonas de la sublínea L2 para caracterizarlas en cuanto a sus niveles de expresión de FcγRI. Seis de las ocho clonas presentaron un nivel de expresión de FcγRI similar al de las sublíneas L2 y Control, y al de la línea THP-1, mientras que dos de las ocho clonas presentaron diferentes niveles de expresión de FcγRI, la clona L2-G3 presentó un menor nivel de expresión, mientras que la clona L2-G6 presentó un nivel de expresión mayor. Durante esta etapa se continuó con el análisis de expresión de CD13 y se verificó que no se presentaban cambios en los niveles de expresión de CD13 en las clonas respecto de la sublínea parental L2 (Figura 9).

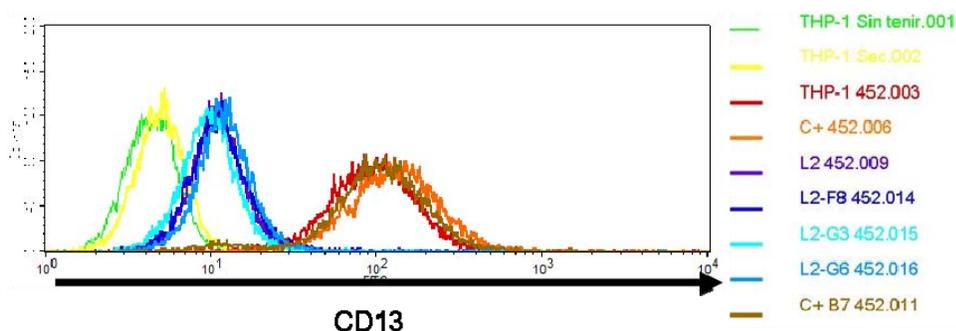


Figura 9: Histogramas superpuestos de cantidad de eventos (células), en función del logaritmo de la intensidad de fluorescencia (FITC), a la derecha se indican los colores utilizados en las líneas de histograma para los diferentes cultivos; se observa la distribución normal en la expresión de CD13 en la línea THP-1, sublíneas L2 y Control, y las clonas L2-F8, L2-G3, L2-G6 y C-B7.

Estos datos sugieren que no es posible aislar una población de expresión nula de CD13 a partir de la sublínea L2, por clonación por dilución limitante. Lo que resulta en concordancia con los datos de clonación por sorting obtenidos en el laboratorio, en los que se aisló la población de expresión nula de CD13 de la sublínea L2 (Figura 8, barra A) y se cultivó por varias semanas, al cabo de las cuales, se obtuvo una población con un nivel de expresión idéntico al de la

sublínea L2 (datos no mostrados). Por esta razón se propone que al aislar una porción de la población de la sublínea L2, eventualmente se tiene una distribución en los niveles de expresión de CD13 similares a los de la sublínea parental L2, imposibilitando la obtención de cultivos con diferentes perfiles de expresión.

Dado que 6 de las 8 clonas de la sublínea L2 seleccionadas presentaron la misma expresión de CD13 y FcγRI, se seleccionó a una clona (L2-F8) que representara al grupo de las 6 clonas sin cambios en el nivel de expresión de CD13 y FcγRI, y las clonas con menor expresión (L2-G3) y mayor expresión (L2-G6) de FcγRI (Figura 10), para caracterizar la relación entre la expresión de CD13 y FcγRI, y las implicaciones de una menor expresión de CD13 para la fagocitosis mediada por FcγRs.

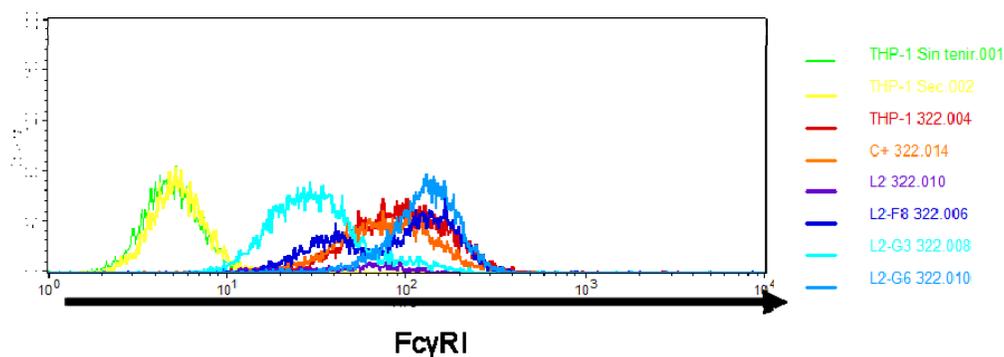


Figura 10: Histogramas superpuestos de cantidad de eventos (células), en función del logaritmo de la intensidad de fluorescencia (FITC), a la derecha se indican los colores utilizados en las líneas de histograma para los diferentes cultivos; se observan los perfiles de expresión de FcγRI en la línea THP-1, sublíneas L2 y Control, y las clonas L2-F8, L2-G3 y L2-G6.

Las 12 clonas Control seleccionadas no presentaron alteraciones en la expresión de CD13 respecto de la sublínea Control o de la línea parental THP-1. Se seleccionaron aleatoriamente 3 clonas para caracterizarlas en cuanto a su expresión de FcγRI, las cuales no presentaron diferencias en la expresión FcγRI (datos no mostrados). Debido a que únicamente constituyeron un control del proceso de clonación, se continuó únicamente el cultivo de una clona (C-B7).

II.- EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE CD13 SOBRE EL TIEMPO DE DUPLICACIÓN CELULAR (PROLIFERACIÓN)

Se investigó si la baja expresión de CD13, en la sublínea L2 y sus clonas, afecta su capacidad proliferativa, ya que se ha reportado que la adición de inhibidores de CD13, mAbs anti CD13 ó la introducción de una secuencia antisentido del mRNA de CD13 disminuye la proliferación celular [143-148].

La línea THP-1, sublíneas L2 y Control, y sus clonas, se sembraron a una densidad de 80,000 células/mL, y se incubaron bajo condiciones habituales. Se determinó la densidad poblacional luego de 24, 48, 72 y 96 horas.

Se recolectaron datos de 4 meses de cultivo y se promediaron los valores de densidad poblacional a las 24, 48, 72 y 96 horas. Se graficó con estos promedios, el logaritmo de la densidad poblacional del cultivo en función del tiempo (Figura 11), y se efectuó una regresión lineal. De la ecuación de la recta resultante, se calcularon los tiempos para tener una densidad poblacional de 200,000 células/mL. y 400,000 células/mL, el tiempo para lograr esta duplicación teórica, se consideró como el tiempo de duplicación celular (Figura 12).

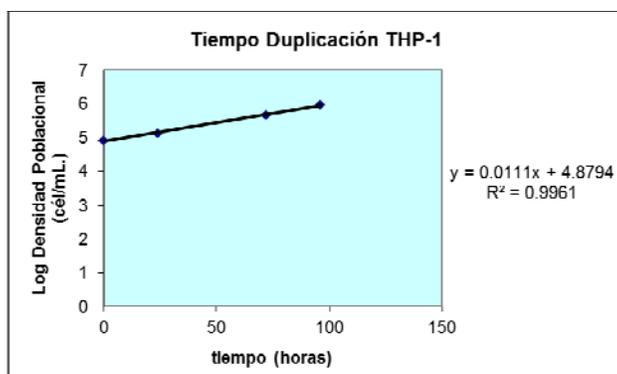


Figura 11: Gráfica del logaritmo de la densidad poblacional en función del tiempo, el valor de densidad poblacional por cada tiempo es un promedio de 7 determinaciones a lo largo de 4 meses.

Cultivo:	Tiempo Estimado de Duplicación Celular
THP-1	27.230 horas
L2	23.923 horas
Control	25.586 horas
L2-F8	23.538 horas
L2-G3	33.980 horas
L2-G6	26.493 horas
Control B7	24.959 horas

Figura 12: Tabla de los tiempos de duplicación celular de cada cultivo.

Se observa que no existe una correlación entre la expresión de CD13 y la velocidad de proliferación (Tabla 2), ya que los cultivos con baja expresión de CD13 (sublínea L2 y sus clonas) no presentan cambios significativos en su velocidad de proliferación con respecto de la línea THP-1 o de la sublínea Control; no obstante, la clona L2-G3, única con menor expresión de CD13 y FcγRI, sí presenta disminución en su velocidad de proliferación.

El aumento en el tiempo de duplicación que presentó la clona L2-G3, no puede atribuirse a la menor expresión de CD13, ya que de ser así, también la sublínea L2, y clonas L2-F8 y L2-G6, deberían presentar disminución en su capacidad proliferativa. La clona L2-G3 es diferente al resto de las clonas seleccionadas, ya que además de presentar el efecto específico de silenciamiento de CD13, presenta una disminución en la expresión de FcγRI, que es una molécula no blanco para el ARNsh utilizado, y dado que no existen reportes que involucren la expresión de FcγRI con la proliferación celular, creemos que esta clona podría tener alteraciones en la expresión de otras moléculas no blanco que sí tienen efecto en la capacidad proliferativa de las células, como receptores a citocinas, sin embargo, son necesarios estudios específicos para confirmar esta teoría.

III.- RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE CD13 Y FcγRI, Y EFECTO DE UNA MENOR EXPRESIÓN DE CD13 EN LA FAGOCITOSIS POR FcγRs

En el laboratorio se ha reportado que la fagocitosis de partículas tratadas para interactuar con la célula fagocítica vía CD13 y FcγRI resulta superior a la fagocitosis de partículas tratadas para interactuar solo a través del FcγRI [162], indicando una relación funcional. Esta relación funcional pudiera reflejarse en co-regulación de su expresión, como sucede con algunas moléculas que participan en un mismo proceso [164-168].

Se efectuaron análisis de expresión de CD13 y FcγRI en la línea THP-1, clonas L2-F8, L2-G3 y L2-G6, utilizando mAb 452 anti CD13 ó mAb 32.2 anti FcγRI. La información se graficó en histogramas de número de eventos (células) en función del logaritmo de intensidad de fluorescencia (FITC) (Figura 13).

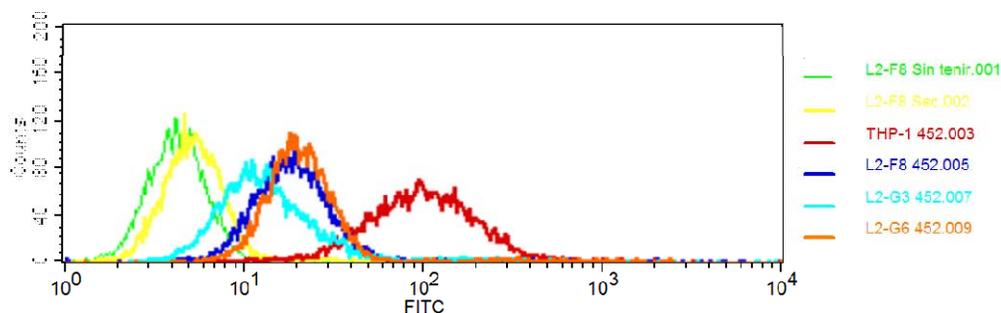
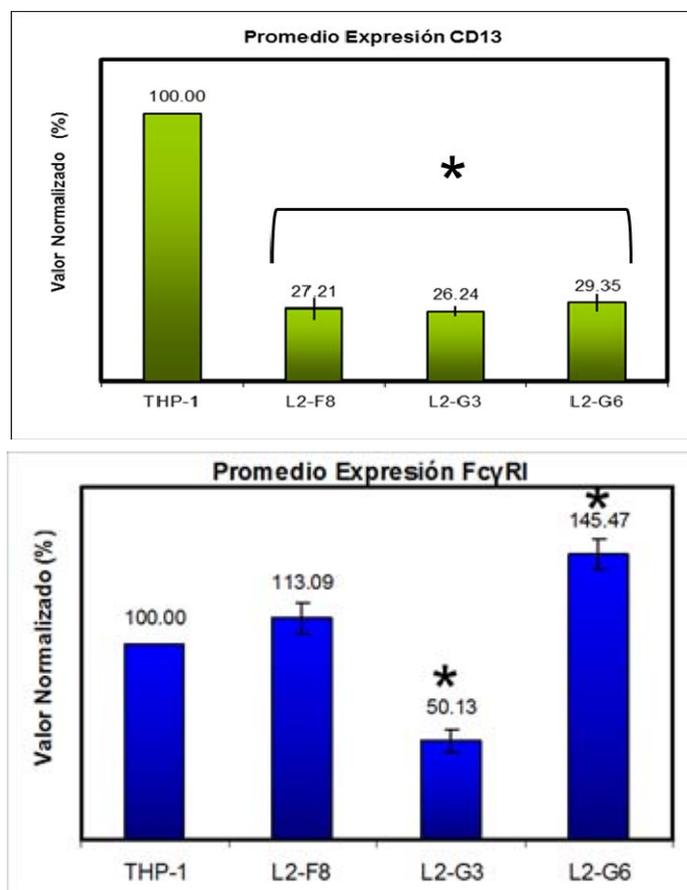


Figura 13: Histogramas superpuestos de cantidad de eventos (células), en función del logaritmo de la intensidad de fluorescencia (FITC), a la derecha se indican los colores utilizados en las líneas de histograma para los diferentes cultivos.

La expresión de CD13 y del FcγRI se evaluó a partir del valor de intensidad media de fluorescencia (IMF), ya que esta refleja la unión del anticuerpo primario (específico de CD13 ó FcγRI), y por tanto, está relacionado con la cantidad de su antígeno presente en la superficie celular. Los valores de IMF de los cultivos L2-F8, L2-G3 y L2-G6, se normalizaron considerando al valor de IMF del cultivo THP-1 como el 100%. Los datos obtenidos se promediaron y se construyó con ellos gráficas de barras (Figuras 14 y 15).

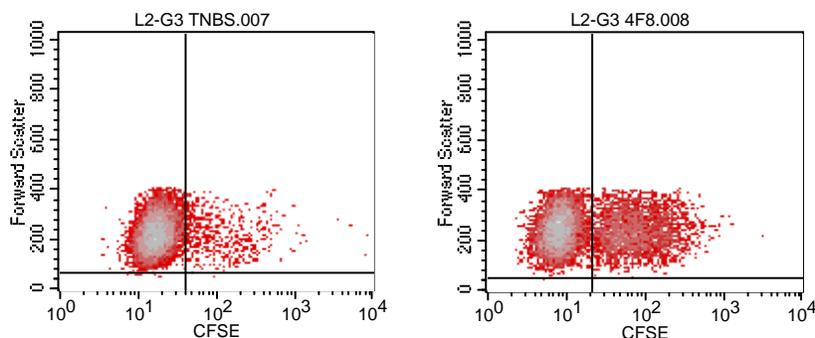


Figuras 14 y 15: Gráficas de los valores promedio, de 5 repeticiones, del análisis de expresión CD13 y FcγRI. Para analizar conjuntamente los resultados de experimentos independientes, los valores fueron normalizados considerando, para cada experimento, a la expresión de CD13 ó FcγRI en la línea THP-1 como el 100%; se muestran los errores estándar de la media y diferencias significativas por valores de $p < 0.05$ en una prueba T de dos colas.

Adicionalmente, para determinar el efecto de una menor expresión de CD13 sobre la fagocitosis por FcγRs, se efectuaron ensayos de fagocitosis mediada por FcγRs en células de la línea THP-1 y clones de la sublínea L2 (como se indica en materiales y métodos).

Células de los cultivos antes mencionados se incubaron a 37° C con eritrocitos opsonizados (fagocitosis específica), a 4° C con eritrocitos opsonizados (unión de los eritrocitos a las células), o se incubaron a 37° C con eritrocitos no opsonizados (fagocitosis no específica). Después de la incubación de las células con los eritrocitos por 2 horas y 30 minutos, los eritrocitos no fagocitados fueron lisados, y tras el lavado de las células, las muestras fueron analizadas por citofluorometría de flujo.

Se adquirieron las muestras, y se utilizó la información obtenida para elaborar gráficas tipo densidad poblacional de tamaño celular en función del logaritmo de intensidad de fluorescencia (CFSE) (Figuras 16 y 17).



Figuras 16 y 17: Gráficas tipo densidad poblacional de tamaño celular en función del logaritmo de la intensidad de fluorescencia (CFSE). Sobre todas las gráficas se estableció una misma división en cuadrantes. Izquierda, células + eritrocitos no opsonizados, incubado a 37° C (fagocitosis no específica); Derecha, células + eritrocitos opsonizados, incubado a 37° C (fagocitosis mediada por FcγRs).

Se consideró a la fagocitosis como el porcentaje de células en el cuadrante superior derecho, ya que, en teoría, representan las células que fagocitaron cuando menos un eritrocito.

Los valores de fagocitosis de los cultivos L2-F8, L2-G3 y L2-G6, se normalizaron considerando al valor de fagocitosis del cultivo THP-1 como el 100%. Los datos obtenidos se promediaron. Posteriormente se efectuó una corrección mediante la resta, para cada cultivo, del valor promedio de fagocitosis no específica al valor promedio de fagocitosis mediada por FcγRs. Los valores promedio corregidos de fagocitosis mediada por FcγRs, se normalizaron nuevamente considerando al valor de fagocitosis del cultivo THP-1 como el 100%, y se construyó con ellos una gráfica de barras (Figura 18).

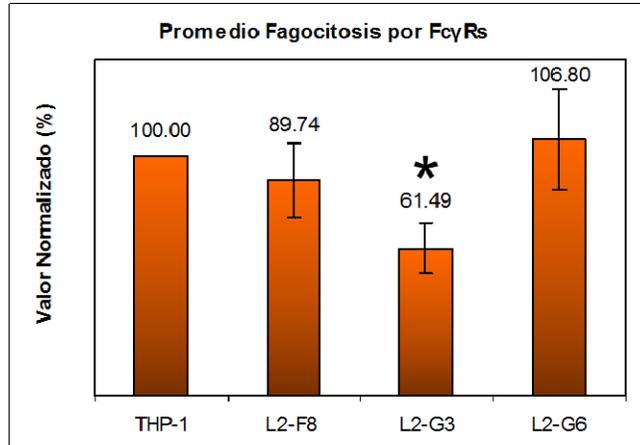


Figura 18: Gráfica de los valores promedio, de 5 repeticiones, de los ensayos de fagocitosis mediada por FcγRs; para analizar conjuntamente los resultados de experimentos independientes, se normalizaron los valores considerando, para cada experimento, a la fagocitosis en el cultivo THP-1 como el 100%; se restaron los valores promedio de fagocitosis no específica a los valores promedio de fagocitosis mediada por FcγRs del mismo cultivo, y se normalizó nuevamente, considerando a la fagocitosis mediada por FcγRs normalizada de la línea THP-1 como el 100%, se muestran los errores estándar de la media y diferencias significativas por valores de $p < 0.05$ en una prueba T de dos colas.

Nuestros resultados sugieren que no existe una relación directa entre la expresión de CD13 y la expresión del FcγRI, ya que como se observa en las gráficas con los valores promedio del nivel de expresión de CD13 y FcγRI (Figuras 14 y 15), los cultivos de las clonas L2-F8, L2-G3 y L2-G6, que no presentan una diferencia significativa en los niveles de expresión de CD13, presentan niveles de expresión de FcγRI significativamente diferentes.

Por otro lado, en estas células, parece ser que una menor expresión de CD13 no afecta la fagocitosis por FcγRs, ya que como se observa en la gráfica con el valor promedio del nivel de expresión de CD13 (Figura 14), los cultivos de las clonas L2-F8, L2-G3 y L2-G6, que presentan niveles de expresión de CD13 significativamente menores respecto de la línea THP-1, no exhiben una disminución en la capacidad fagocítica mediada por FcγRs (Figura 19), excepto el caso de la clona L2-G3 que sí presenta disminución su capacidad fagocítica por FcγRs; no obstante, esto se debe a que expresa un nivel significativamente menor de FcγRI respecto de la línea THP-1 (Figura 15). Estos resultados sugieren que CD13 no es necesario para una adecuada fagocitosis mediada por FcγRs, y que el aumento en la fagocitosis por FcγRs que se presenta por estimulación de CD13 con la partícula a ser fagocitada[162], se debe a su función como receptor fagocítico o a la modulación positiva de la fagocitosis por FcγRs.

IV.- EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN DE CD13 SOBRE LA FAGOCITOSIS MEDIADA POR FcγRs

Para determinar si el entrecruzamiento del CD13 es capaz de influir, mediante señalización, en la fagocitosis mediada por FcγRs. Se realizaron ensayos de fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG en células monocíticas THP-1 (fagocitosis mediada por FcγRs) estimulando a CD13 por entrecruzamiento con F(ab')₂ de 452 y un anticuerpo secundario cabra anti IgG de ratón (como se indica en materiales y métodos). El entrecruzamiento se sabe capaz de estimular la señalización mediada por receptores [169-173] (al no entrecruzar CD13 con la partícula a fagocitar se evita su participación como receptor fagocítico).

Se incubaron las células con o sin entrecruzamiento de CD13, a 37° C con eritrocitos opsonizados (fagocitosis mediada por FcγRs), a 4° C con eritrocitos opsonizados (unión de los eritrocitos a las células), o se incubaron a 37° C con eritrocitos no opsonizados (fagocitosis no específica). Después de la incubación de las células con los eritrocitos por 2 horas y 30 minutos, los eritrocitos no fagocitados fueron lisados, y tras el lavado de las células, las muestras fueron analizadas por citofluorometría de flujo.

Las muestras se analizaron de la forma en la que se efectuó para los experimentos de fagocitosis mediada por FcγRs, en los cultivos THP-1 y clonas L2-F8, L2G3 y L2-G6, de la sección previa. Los valores de fagocitosis bajo las diferentes condiciones se normalizaron considerando al valor de fagocitosis mediada por FcγRs en el cultivo THP-1 como el 100%. Los datos obtenidos se promediaron y se construyó con ellos una gráfica de barras (Figura 19).

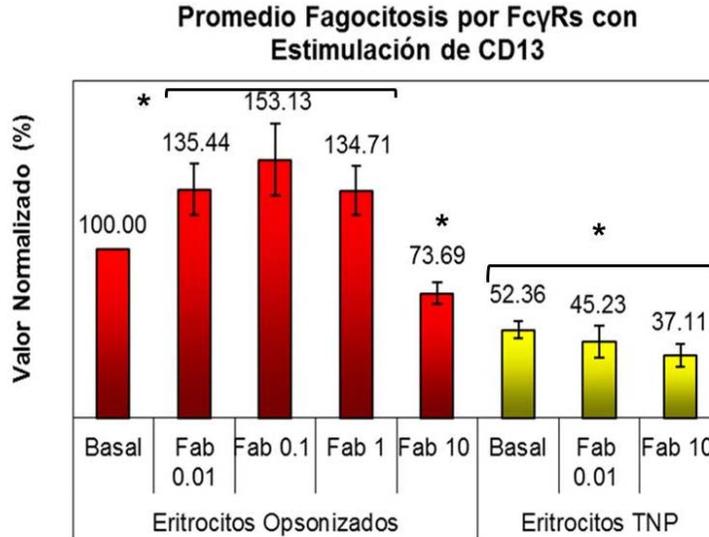


Figura 19: Gráfica de los valores promedio (7 experimentos) de los ensayos de fagocitosis mediada por FcγRs con estimulación por entrecruzamiento de CD13. Para analizar conjuntamente los resultados de experimentos independientes, se normalizaron los valores considerando, para cada experimento, a la fagocitosis mediada por FcγRs, en ausencia de estimulación de CD13, como el 100%; el conjunto de barras de la izquierda muestra los valores de fagocitosis mediada por FcγRs, indicando como Fab, las diferentes cantidades de F(ab')₂ 452 utilizado en la estimulación de CD13; el conjunto de barras de la derecha indican los valores de la fagocitosis no específica; se muestran los errores estándar de la media y diferencias significativas por valores de p<0.05 en una prueba T de dos colas.

Para cuantificar la unión a CD13 por las diferentes cantidades de F(ab')₂ de 452 usadas (0µg, 0.01µg, 0.1µg, 1µg, 10µg), se midió la cantidad relativa de F(ab')₂ de 452 unido a las células mediante citofluorometría de flujo, como se indica en la sección de materiales y métodos. La unión a CD13 por las diferentes cantidades de F(ab')₂ de 452 se evaluó a partir del valor de intensidad media de fluorescencia (IMF). Los valores de IMF de las diferentes dosis de F(ab')₂ de 452 se normalizaron considerando al valor de IMF del anticuerpo 452 completo como el 100%. Los datos obtenidos se promediaron y se construyó con ellos una gráfica de barras (Figura 20).

Nota: Los niveles de expresión de FcγRI determinados con el mAb 32.2, utilizado para verificar la expresión de moléculas de superficie (información no presentada), fueron en todos los casos similares a los niveles previos de expresión de FcγRI para el cultivo THP-1.

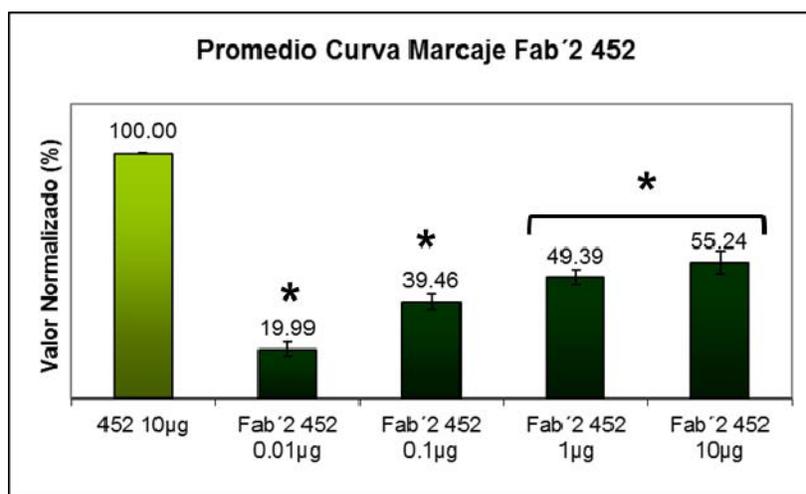


Figura 20: Gráfica de los valores promedio de 8 experimentos, de la curva de unión a CD13 por los Fab'2 de mAb 452, y 452 completo. Para analizar conjuntamente los resultados de experimentos independientes, los valores fueron normalizados considerando, para cada experimento, la unión a CD13 por el mAb 452 completo como el 100%;. Se muestran los errores estándar de la media y diferencias significativas por valores de $p < 0.05$ en una prueba T de dos colas.

Los valores indican que la estimulación de CD13, por entrecruzamiento con anticuerpos, modula positivamente la fagocitosis por FcγRs (Figura 19), ya que la estimulación de CD13 con 0.01µg, 0.1 µg y 1µg de F(ab')₂ de 452 aumenta significativamente la fagocitosis mediada por FcγRs.

La necesidad de entrecruzar a CD13 con los anticuerpos para modular positivamente la fagocitosis por FcγRs, resulta congruente con la ausencia de modulación positiva de la fagocitosis que se presenta con la adición de 10µg de F(ab')₂ de 452 (Figura 19), ya que como se observa en la curva de unión a CD13 por los F(ab')₂ de 452 (Figura 20), las dosis de 1µg y 10µg presentan el mismo nivel de unión, de manera que tras la adición del anticuerpo secundario, estas dos condiciones varían en la proporción de anticuerpo secundario respecto de los F(ab')₂ de 452, presentándose un exceso en la dosis de 10µg, que dificulta el entrecruzamiento de CD13.

El hecho de que la estimulación de CD13 con 10µg presente una disminución significativa sobre la fagocitosis por FcγRs (Figura 19), podría atribuirse a que como ya se mencionó, en esta condición, presumiblemente existe un exceso de anticuerpo secundario, que podría fungir como un interferente unido a CD13, el cual se sabe es movilizado a la copa fagocítica[162], dificultando la

interacción de FcγRs con partículas opsonizadas, con la consecuente disminución en la eficiencia de la fagocitosis mediada por FcγRs.

En cuanto a la curva de unión a CD13 por los F(ab')₂ de 452 (Figura 20), se presenta aumento en la unión a CD13 por los F(ab')₂ de 452 en forma dosis dependiente, donde la dosis de 0.01 μg se une significativamente en menor medida que la dosis de 0.1 μg; y la dosis de 0.1 μg se une significativamente en menor medida que la dosis de 1 μg; no obstante, la dosis de 1 μg no se une en forma significativamente menor a la dosis de 10 μg, con las posibles implicaciones para los ensayos de fagocitosis mediada por FcγRs, antes mencionadas.

Los resultados en la curva de unión a CD13 por los F(ab')₂ de 452 (Figura 20), resultan congruentes con el aumento, también en forma dosis dependiente, de la fagocitosis mediada por FcγRs por la estimulación de CD13 con 0.01 μg y 0.1 μg de F(ab')₂ de 452; mientras que la menor estimulación e inhibición de la fagocitosis mediada por FcγRs que se presenta en la adición de 1 μg y 10 μg de F(ab')₂ de 452 respectivamente (Figura 19), podrían atribuirse a problemas en el entrecruzamiento de CD13 por exceso de anticuerpo secundario, y a la participación del anticuerpo secundario como interferente en la unión de partículas opsonizadas a los FcγRs, como se señaló previamente.

En conjunto, los datos sugieren que la estimulación de CD13 por entrecruzamiento, modula positivamente la fagocitosis mediada por FcγRs. Esto puede sugerir que CD13 es capaz de generar, al interior de la célula, señales bioquímicas que sinergizan con las generadas por los FcγRs, resultando en una mayor fagocitosis. El modelo que se propone para esta modulación es el siguiente (Figura 21):

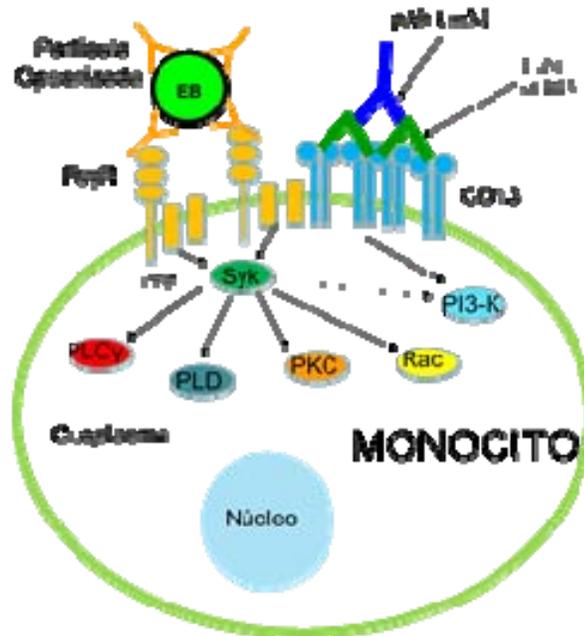


Figura 21: Esquema del mecanismo propuesto para la modulación positiva de CD13 sobre la fagocitosis mediada por FcγRs.

Se propone que el entrecruzamiento de CD13 induce un cambio conformacional que promueve señalización favorable a la fagocitosis, como la activación de PI3-K, adicional a la PI3-K activada por los FcγRs. La sugerencia de que el sinergismo es a nivel de PI3-K se basa en que se ha reportado la activación de esta enzima a través de CD13 [132]. Sin embargo, es posible que CD13 genere la activación de otras moléculas involucradas. Se ha demostrado que PI3-K es indispensable en la señalización de FcγRs [3, 5, 21].

CONCLUSIONES

1.-En líneas monocíticas humanas la expresión de CD13 no guarda relación con la expresión de FcγRI.

2.-Una menor expresión de CD13 no afecta la eficiencia de la fagocitosis mediada por FcγRs en líneas monocíticas humanas.

3.-La expresión disminuida de CD13 no afecta la velocidad de proliferación de líneas monocíticas humanas.

4.-La estimulación de CD13, por entrecruzamiento con anticuerpos, es capaz de modular positivamente la fagocitosis mediada por FcγRs.

ANEXOS

I.-PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS

1.-DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD13 CON ARNsh

1.1.-Vectores Lentivirales

Los lentivirus pertenecen a la familia *Retroviridae*, su genoma consiste de dos ARN de cadena simple de sentido positivo. Las regiones que codifican proteínas están flanqueadas por LTRs 3' y 5', aquí se encuentran elementos que actúan *cis*, incluyendo señales importantes para la integración del provirus, secuencias potenciadoras/promotoras, elementos de respuesta a transactivación (TAR) y la señal de poliadenilación (polyA).

Además de los LTRs, el provirus contiene otras secuencias activadoras *cis* como el sitio de unión a primer (PBS), señales de empaquetamiento/dimerización del ARN viral (ψ y DIS), tracto central de poliuridina (cPPT), la secuencia central de término (CTS), el elemento de respuesta a Rev (RRE), esencial para el transporte post-transcripcional de ARNm virales, del núcleo al citoplasma, y la la región rica en purina (PPT), que funciona como segundo primer de ARN en el inicio de la síntesis de una hebra positiva de DNA, por la transcriptasa reversa [175, 176].

Los elementos activadores *trans* incluyen 9 marcos abiertos de lectura (ORFs), los ORFs de gag-pol, gag y env codifican proteínas estructurales y enzimas, otros ORFs codifican proteínas reguladoras como *tat* y *rev*.

Existen 19 proteínas codificadas en el provirus que participan como estructurales, enzimas, proteínas de cubierta, reguladoras y accesorias.

El LTR 5' dirige la transcripción de un genoma de ARN inicial, que actúa también como ARNm de las proteínas de cubierta Gag y Pol; la proteína Gag es cortada, por la proteasa viral, para formar la matriz (MA), cápside (CA), nucleocápside (NC), p6 y 2 polipéptidos espaciadores; el precursor Gag-pol es cortado, por esta misma proteasa, dando lugar a p6, y 3 enzimas virales: la proteasa (PR), la transcriptasa reversa (RT) con actividad ribonucleasa H (ARNasa H) y la integrasa (IN).

El transcrito primario codifica también otras proteínas reguladoras, proteínas auxiliares, proteínas accesorias; además del ORF de *env*, que al traducirse forma al precursor gp160, el cual es cortado para formar las subunidades gp120 y gp41 [175].

En el caso del VIH la envoltura lipídica mide 80-120nm de diámetro y contiene proteínas de la célula hospedera importantes en su replicación y patogénesis. El ciclo de replicación viral comienza por unión de gp120 al receptor CD4, principalmente de linfocitos cooperadores, provocando un cambio conformacional en gp120 que forma un sitio de unión para un coreceptor, comúnmente el receptor β a quimiocina (CCR5) o el receptor α a quimiocina (CXCR4); una vez iniciada la fusión, el núcleo viral es liberado al citoplasma, de donde, por unión a microtúbulos, es transportado al núcleo. Una alternativa y eficiente ruta de infección es la transmisión célula-célula, que inicia por contacto a través de sinapsis virales.

El proceso de retrotranscripción forma al cDNA viral, que es importado al núcleo, donde es integrado al DNA cromosómico como provirus (~9.7Kb), eventualmente se presenta la transcripción del ARN viral por la maquinaria celular, el transcrito primario madura y es exportado del núcleo, entonces ocurre la expresión de las proteínas virales. La producción de viriones involucra eventos como la dimerización y oligomerización de Gag, unión de Gag al genoma de ARN viral, transporte de los complejos Gag-ARN, Gag-pol, Gag y Env al sitio de ensamblaje, y la subsecuente liberación de los viriones inmaduros que son procesados por la proteasa viral para convertirse en partículas infecciosas. Los lentivirus completan su ciclo de replicación desprendiéndose de la membrana citoplásmica.

Los vectores lentivirales constituyen una herramienta para la introducción de transgenes a células de mamífero, tienen la capacidad de infectar células en división y no en división, incluyendo monocitos, con altas tasas de transferencia; se integran al ADN celular, preferentemente en intrones de regiones cromosómicas donde abundan genes continuamente expresados; y promueven una estable y duradera expresión del transgen [175, 177].

La construcción de vectores lentivirales se basa en separar las secuencias indispensables para la síntesis del ARN viral, empaquetamiento, retrotranscripción e inserción del cDNA; de las enzimas virales, y proteínas estructurales y accesorias, para evitar una recombinación que genere lentivirus replicativos.

Pueden cotransfectarse vectores de expresión de proteínas de envoltura heterólogas, como las del virus de leucemia de linfocitos T humanos tipo I (HTLV-1 Env), y así generar viriones capaces de infectar diferentes tipos de células.

El cDNA debe contener fuertes promotores, como H1 y U6, y un gen reportero, como uno de resistencia a antibióticos [175, 176].

1.2.-ARNsh

Los ARNs de interferencia (ARNi), fueron identificados como un mecanismo antiviral por formación de ARN de doble hebra (dsRNA).

Existen micro ARNs (miRNAs), transcritos como dsRNA tipo bucle (hairpin RNAs), denominados ARNsh, la transducción de la secuencia del ARNsh dirigido a un ARNm conduce al silenciamiento en la expresión de ese gen (Figura 22)[176, 178].

Los ARNsh consisten de una secuencia sentido, de 19-23 nucleótidos, idéntica a una porción del ARNm blanco, seguida de un bucle de 9 nucleótidos, posteriormente la secuencia complementaria antisentido, y un tracto final de 5T's, como señal de término para Pol III.

Los ARNsh son identificados por una ARNasa de la familia III, denominada Dicer, la cual escinde los ARNsh a los segmentos de 21-23 nucleótidos denominados ARN pequeños interferentes (siRNAs).

Los siRNAs son incorporados al complejo multicomponente de nucleasas (RISC), conduciendo la destrucción del ARN mensajero (ARNm) complementario a los siRNAs [175-177].

La eficiencia de un ARNsh es impredecible, y refleja la factibilidad de su maduración y la accesibilidad del ARNsi a la estructura del ARNm; las secuencias de silenciamiento pueden estar dirigidas al 5'UTR, ORF o 3'UTR del ARNm [176].

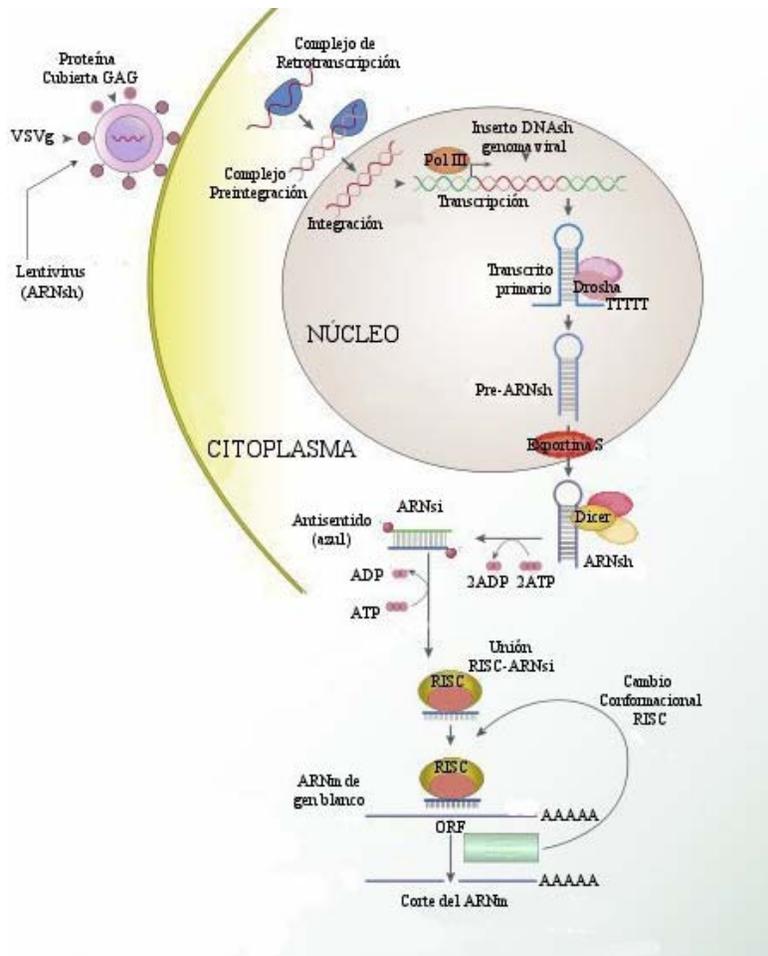


Figura 22: Esquema del silenciamiento génico por ARNsh, introduciendo la secuencia por transducción con un vector lentiviral. (Modificado de Dun Cojocari, Department of Medical Biophysics, Universidad de Toronto, 2010).

1.3.-Construcción de las Sublíneas L2 y Control

Previamente en este laboratorio, con el propósito de abatir la expresión de CD13 en la línea monocítica THP-1, para efectuar experimentos sobre la implicación de una menor expresión de CD13 en diferentes funciones celulares, se empleó el vector NM-001150 (Sigma), que contenía plásmidos codificantes de secuencias ARNsh dirigidas al ARNm de CD13 y un gen reportero de resistencia a la Puomicina, para transducir (utilizando polibreno para aumentar la eficiencia de la transducción), células THP-1. De esta forma, y luego de la selección de los cultivos en los que se logró abatir en mayor medida la expresión de CD13, se obtuvo la sublínea L2.

Con el propósito de obtener una sublínea control del proceso de transducción, se empleo un vector lentiviral, que contenía secuencias codificantes de ARNsh para el ARNm de proteína verde fluorescente (GFP) y un gen reportero de resistencia a la Puromicina, construido a partir del plásmido PLKO.1 puro, para transducir (utilizando polibreno para aumentar la eficiencia de la transducción), células THP-1. De esta forma se obtuvo la sublínea Control.

2.-CLONACIÓN POR DILUCIÓN LIMITANTE

2.1.- Descripción

La clonación por dilución limitante es un proceso de separación de células de una población mixta, basado en el supuesto que al diluir una suspensión celular, es posible obtener una concentración tal, que la exacta obtención de un volumen dado, permita sustraer una única célula.

Debido a que el método de conteo, utilizado para determinar la concentración de la suspensión celular inicial, esta basado en muestreo estadístico (cámara de Neubauer), no todos los pozos recibirán una célula.

Muchos protocolos indican preparar una suspensión celular de una concentración de 100 células/mL, otra de 10 célula/mL y una de 1 célula/mL, y sembrar, en placa de 96 pozos, 100µL de estas suspensiones por pozo, de esta manera algunos pozos contendrán alrededor de 10 células, algunos 1-10 células, algunos una célula y otros no contendrán célula alguna. Si este procedimiento se efectúa cuidadosamente, muchos pozos serán sembrados con 1 célula.

Una vez sembrados los pozos, cada pozo en teoría con una célula, en los casos en que la célula permanece viable y prolifera, entonces la progenie resultará genéticamente idéntica, de esta manera se genera una clona. Es frecuente efectuar experimentos de caracterización de las clonas, para seleccionar aquellas con el perfil deseado.

2.2.- Obtención de Clonas de las Sublíneas L2 y Control

Con el propósito de obtener diferentes perfiles de expresión de CD13, a partir de la sublínea L2 (de baja expresión de CD13), se efectuó clonación por dilución limitante.

A partir de un cultivo de la sublínea L2, incubado bajo condiciones habituales (descritas en la sección de materiales y métodos), se procedió a efectuar un conteo cuidadoso y por duplicado.

El conteo permitió efectuar diluciones seriadas, hasta contar con una suspensión celular de 100 células/mL, de la cual se prepararon suspensiones de 10 y 1 células/mL. Estas 3 suspensiones se utilizaron en la siembra de una placa de 96 pozos, 2 líneas (24 pozos) con la suspensión de 100 células/mL, 3 líneas (36 pozos) con la suspensión de 10 células/mL, y las restantes 3 líneas (36 pozos) con la suspensión de 1 célula/mL. Esta placa se colocó en incubación, luego de 14 días, se observó en algunos pozos el crecimiento de agregados celulares, se procedió entonces a identificar aquellos que contuvieran un solo agregado, ya que se asumió a estos pozos, como aquellos donde se había logrado sembrar una célula inicial, los agregados de 12 pozos, seleccionados de manera aleatoria, fueron trasladados a placas para cultivo celular de 24 pozos para continuar la expansión de la clona, a estas clonas se les asignó el código alfanumérico del pozo en el que estaban contenidas inicialmente (por ejemplo, F8).

Las clonas se colocaron en incubación, posteriormente se utilizó una fracción de la población en experimentos de análisis de expresión de CD13, todas las clonas presentaron niveles de expresión de CD13 similares al de la sublínea L2, se seleccionaron aleatoriamente 8 clonas, que fueron trasladadas a una placa para cultivo celular de 12 pozos.

Las clonas se colocaron en incubación, retirándose periódicamente alícuotas para efectuar análisis de expresión de CD13 y FcγRI, y determinar si se presentaban cambios en la expresión de estas moléculas respecto de la sublínea L2, lo que no ocurrió, salvo por la clona L2-G3 que presentó una menor expresión

de FcγRI, al final de esta etapa se seleccionaron 3 clonas L2-F8, L2-G3 y L2-G6, que fueron trasladadas a frascos para cultivo celular.

Estas clonas se utilizaron en el análisis de expresión de CD13 y FcγRI; y ensayos de fagocitosis mediada por FcγRs. Esta misma metodología se efectuó, de manera simultánea, en la sublínea Control, obteniéndose 12 clonas, que presentaron un nivel de expresión de CD13 similar al de la sublínea Control, posteriormente se seleccionaron 3 clonas C-B7, C-B8 y C-B9, en las que analizó la expresión de FcγRI, presentando niveles de expresión similares al de la sublínea Control.

Por la similitud de las clonas en niveles de expresión de CD13 y FcγRI, y ya que su única función era la de proporcionar un control del proceso de clonación, se determinó continuar únicamente el cultivo de C-B7.

II.-IMÁGENES DE CULTIVOS

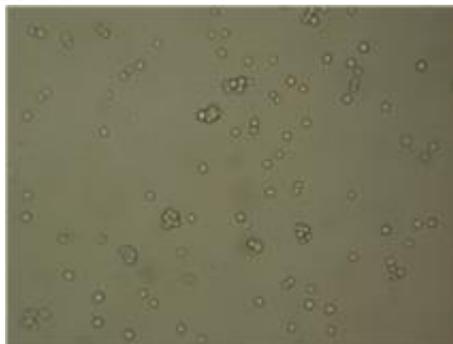
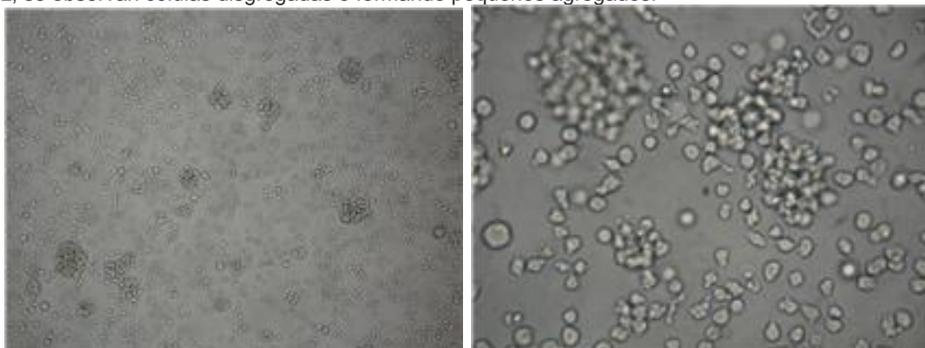
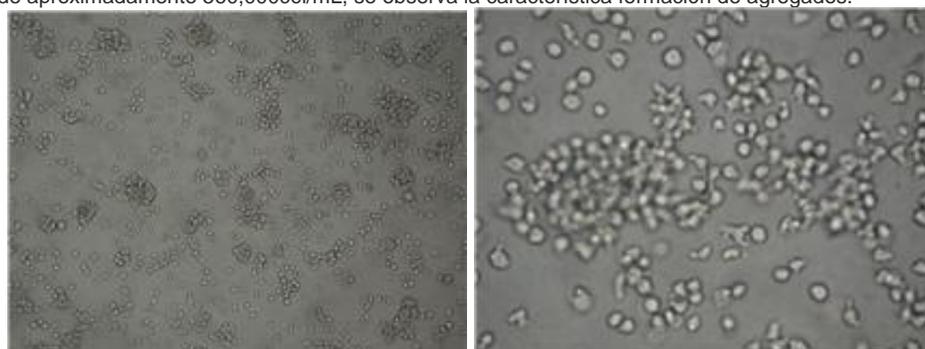


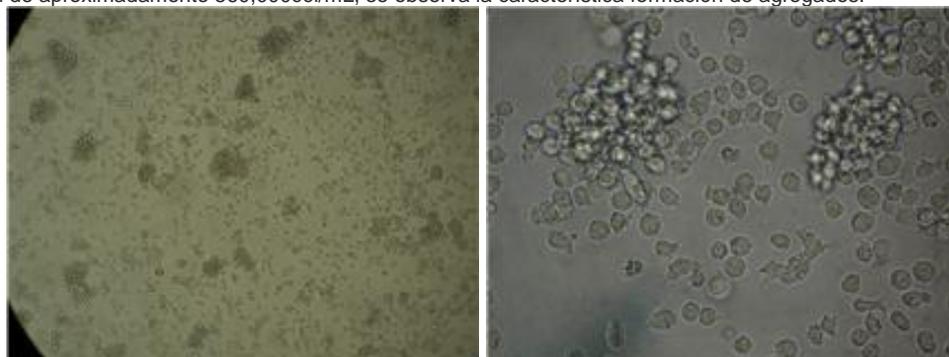
Figura 23: Fotografía del cultivo de la línea THP-1, Objetivo 10 X. Cultivo en densidad poblacional de aproximadamente 80,000cél/mL, se observan células disgregadas o formando pequeños agregados.



Figuras 24 y 25: Fotografías del cultivo de la línea THP-1: (izq.) Objetivo 10 X, (der.) Objetivo 40 X. Cultivo en densidad poblacional de aproximadamente 560,000cél/mL, se observa la característica formación de agregados.



Figuras 26 y 27: Fotografías del cultivo de la sublínea L2: (izq.) Objetivo 10 X, (der.) Objetivo 40 X. Cultivo en densidad poblacional de aproximadamente 560,000cél/mL, se observa la característica formación de agregados.



Figuras 28 y 29: Fotografías del cultivo de la sublínea Control: (izq.) Objetivo 10 X, (der.) Objetivo 40 X. Cultivo en densidad poblacional de aproximadamente 560,000cél/mL, se observa la característica formación de agregados.

III.- ABREVIATURAS

(AA.) Ácido araquidónico
(aa.) Aminoácidos
(Abs) Anticuerpos
(mAbs) Anticuerpos monoclonales
(pAbs) Anticuerpos policlonales
(ADCC) Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
(Akt) Cinasa antiapoptótica
(APN) Aminopeptidasa N
(ARN) Ácido Ribonucleico
(ARNasa H) Ribonucleasa H
(ARNi) ARN de interferencia
(ARNsh) preARN de silenciamiento en bucle
(ATCC) American Type Cell Culture Collection
(BCR) Receptor de linfocitos B
(BSA) Albúmina de suero bovino
(CA) Cápside
(CCR5) Receptor β a quimiocina
(sCD13) Forma soluble de CD13
(CFSE) Carboxifluoreseín Succinimidil éster
(CTS) Secuencia central de término
(CXCR4) Receptor α a quimiocina
(DAG) Diacilglicerol
(DCs) Células dendríticas
(DGVB) Disolución gelatina, dextrosa y barbital
(DIS) Señal dimerización
(EDTA) Ácido etilendinitrilo tetraacético
(ERK) Cinasa regulada por señales extracelulares
(Fc) Fracción cristalizable de anticuerpos
(Fc γ Rs)Receptores para la fracción cristalizable de Inmunoglobulinas G
(FGF-2) Factor de Crecimiento de Fibroblastos
(GAPs) Proteínas activadoras de GTPasas
(G-CSF) Factor estimulante de colonias de granulocitos
(GPI) Glicosilfosfatidilinositol
(GFP) Proteína verde fluorescente
(HA) Agregación homotípica
(HLA) Antígeno humano de leucocitos
(HTLV-1 Env) Envoltura del virus de leucemia de linfocitos T humanos tipo I
(HUVECs) Células endoteliales de vena umbilical humana
(IFN- γ) Interferón γ
(IgG) Inmunoglobulinas G
(IL) Interleucina
(ILTs)Transcritos similares a inmunoglobulina
(IN) Integrasa
(IP₃) Inositol trifosfato
(IP₄) Inositol-1,3,4,5-polifosfato
(IRF 3) Factor regulador de interferones 3
(ITAM) Motivo de activación basado en tirosina
(ITIM) Motivo de inhibición basado en tirosina
(LPS) Lipopolisacárido
(LTRs) Repetidos terminales largos
(MA) Matriz
(MAPK) Proteína cinasa activada por mitógeno
(MCP-1) Proteína quimiotáctica de monocitos 1
(MHC-Tipo I) Moléculas tipo I del complejo mayor histocompatibilidad
(MHC-Tipo II) Moléculas tipo II del complejo mayor histocompatibilidad
(MIP- α) Proteína inflamatoria de macrófagos α
(MIRRs) Receptores de reconocimiento inmune multicadena
(MIS) Inhibidor mieloide de ratón
(MTA-1) Antígeno de tumores metastáticos 1
(NADPH) Forma reducida de nicotinamida dinucleótido adenina fosfato

(NC) Nucleocápside
 (NF-κB) Factor nuclear κB
 (NSF) Factor sensible a N-etilmaleimida
 (ORFs) Marcos abiertos de lectura
 (PAMPs) Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
 (PAP-1) Fosfatasa-1 del ácido fosfatídico
 (PBS) Disolución amortiguadora de fosfatos
 (PBS) Sitio de unión a primer
 (PI3-K) Fosfatidil inositol 3 cinasa
 (PIC) Complejo de preintegración
 (PIP2) Fosfatidilinositolbifosfato
 (PIP3) Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
 (PIs) Fosfoinositídicos
 (PI(4)P) Fosfatidilinositol-4-fosfato
 (PKA) Proteína cinasa A
 (PKC) Proteína cinasa C
 (PKR) Proteína cinasa serina/treonina
 (PLA-2) Fosfolipasa A2
 (cPLA-2) PLA-2 citoplásmica dependiente de Ca²⁺
 (iPLA-2) PLA-2 citoplásmica independiente de Ca²⁺
 (PLCγ) Fosfolipasa Cγ
 (PLD) Fosfolipasa D
 (polyA) Señal de poliadenilación
 (PMN) Leucocitos Polimorfonucleares
 (PolIII) ADN polimerasa tipo III
 (cPPT) Tracto central de poliurina
 (PR) Proteasa
 (PRRs) Receptores de reconocimiento de patrones
 (RECK) Proteína rica en cisteína inductora de reversión con motivos Kazal
 (RISC) Complejo multicomponente de nucleasas
 (RRE) Elemento de respuesta a Rev
 (RT) Transcriptasa reversa
 (dsRNA) ARN de doble hebra
 (miRNAs) Micro ARNs
 (siRNAs) ARN pequeños interferentes
 (SFB) Suero fetal bovino
 (SH-2) Dominios de homología a Src-2
 (Siglecs) Lectinas similares a inmunoglobulinas de unión a ácido siálico
 (SIRPα) Proteínas reguladoras de señal
 (SNAREs) Receptores de la proteína soluble de anclaje NSF
 (SNC) Sistema Nervioso Central
 (TAR) Elementos de respuesta a transactivación
 (TCR) Receptor de linfocitos T
 (TGF-β) Factor transformador del crecimiento β
 (TLRs) Receptores tipo Toll
 (TNBS) Ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico
 (TNF-α) Factor de necrosis tumoral α
 (UTR) Región no traducida
 (VIH) Virus de inmunodeficiencia humana

IV.- ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de un monocito.....	4
Figura 2: Esquema de la fagocitosis mediada por FcγRs.....	7
Figura 3: Diagrama de la señalización inducida en la fagocitosis mediada por FcγRs.....	12
Figura 4: Diagrama de la señalización inhibitoria inducida por FcγRIIb vía SHIP-1.....	13
Figura 5: Esquemá de las estructura de los FcγRs.....	15
Figura 6: Estructuras propuestas para las diferentes moléculas de superficie que se han reportado capaces de interactuar con FcγRs en procesos de señalización.....	18
Figura 7: Esquema de la Aminopeptidasa N (CD13).	22
Figura 8: Histogramas superpuestos de cantidad de eventos (células), en función del logaritmo de la intensidad de fluorescencia (FITC).....	40
Figura 9: Histogramas superpuestos de cantidad de eventos (células), en función del logaritmo de la intensidad de fluorescencia (FITC), expresión de CD13.....	41
Figura 10: Histogramas superpuestos de cantidad de eventos (células), en función del logaritmo de la intensidad de fluorescencia (FITC), expresión de FcγRI.....	42
Figura 11: Gráfica del logaritmo de la densidad poblacional en función del tiempo, cultivo THP-1.....	43
Figura 12: Tabla de los tiempos de duplicación celular de cada cultivo.....	43
Figura 13: Histogramas superpuestos de cantidad de eventos (células), en función del logaritmo de la intensidad de fluorescencia (FITC).....	45
Figuras 14 y 15: Gráficas de barras de los valores promedio, de 5 repeticiones, del análisis de expresión CD13 y FcγRI.....	46
Figuras 16 y 17: Gráficas tipo densidad poblacional de tamaño celular en función del logaritmo de la intensidad de fluorescencia (CFSE).....	47
Figura 18: Gráfica de barras de los valores promedio, de 5 repeticiones, de los ensayos de fagocitosis mediada por FcγRs.....	48
Figura 19: Gráfica de barras de los valores promedio, de 7 experimentos, de los ensayos de fagocitosis mediada por FcγRs con estimulación de CD13.....	50
Figura 20: Gráfica de barras de los valores promedio, de 8 experimentos, de la curva de unión a CD13 por los Fab ₂ de 452, y 452 completo.....	51
Figura 21: Esquema del mecanismo propuesto de la modulación positiva de CD13 sobre la fagocitosis mediada por FcγRs.....	53
Figura 22: Esquema del silenciamiento génico con ARNsh, secuencia suministrada por trasducción con vector lentiviral.....	58
Figura 23: Fotografía del cultivo de la línea THP-1, Objetivo 10 X. Cultivo en densidad poblacional de aproximadamente 80,000cél/mL.....	62
Figuras 24 y 25: Fotografías del cultivo de la línea THP-1: (izq.) Objetivo 10 X, (der.) Objetivo 40 X. Cultivo en densidad poblacional de aproximadamente 560,000cél/mL.....	62
Figuras 26 y 27: Fotografías del cultivo de la sublínea L2: (izq.) Objetivo 10 X, (der.) Objetivo 40 X. Cultivo en densidad poblacional de aproximadamente 560,000cél/mL.....	62
Figuras 28 y 29: Fotografías del cultivo de la sublínea Control: (izq.) Objetivo 10 X, (der.) Objetivo 40 X. Cultivo en densidad poblacional de aproximadamente 560,000cél/mL.....	62

REFERENCIAS

1. Becker, S., *Function of the Human Mononuclear System*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1988. **2**: p. 1-29.
2. Brown, E.J., *Phagocytosis*. Bioessays, 1995. **17**(2): p. 109-17.
3. Indik, Z.K., et al., *The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis*. Blood, 1995. **86**(12): p. 4389-99.
4. Allen, L.A. and A. Aderem, *Mechanisms of phagocytosis*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(1): p. 36-40.
5. Garcia-Garcia, E. and C. Rosales, *Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(6): p. 1092-108.
6. Niedergang, F. and P. Chavrier, *Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(4): p. 422-8.
7. Hackam, D.J., et al., *v-SNARE-dependent secretion is required for phagocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11691-6.
8. Zerial, M. and H. McBride, *Rab proteins as membrane organizers*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(2): p. 107-17.
9. Bajno, L., et al., *Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation*. J Cell Biol, 2000. **149**(3): p. 697-706.
10. Mercanti, V., et al., *Selective membrane exclusion in phagocytic and macropinocytic cups*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 19): p. 4079-87.
11. Pierini, L., D. Holowka, and B. Baird, *Fc epsilon RI-mediated association of 6-micron beads with RBL-2H3 mast cells results in exclusion of signaling proteins from the forming phagosome and abrogation of normal downstream signaling*. J Cell Biol, 1996. **134**(6): p. 1427-39.
12. Clemens, D.L. and M.A. Horwitz, *Membrane sorting during phagocytosis: selective exclusion of major histocompatibility complex molecules but not complement receptor CR3 during conventional and coiling phagocytosis*. J Exp Med, 1992. **175**(5): p. 1317-26.
13. Braun, V., et al., *TI-VAMP/VAMP7 is required for optimal phagocytosis of opsonised particles in macrophages*. Embo J, 2004. **23**(21): p. 4166-76.
14. Jongstra-Bilen, J., R. Harrison, and S. Grinstein, *Fcgamma-receptors induce Mac-1 (CD11b/CD18) mobilization and accumulation in the phagocytic cup for optimal phagocytosis*. J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 45720-9.
15. Silver, K.E. and R.E. Harrison, *Kinesin 5B is necessary for delivery of membrane and receptors during FcgammaR-mediated phagocytosis*. J Immunol, 2011. **186**(2): p. 816-25.
16. Rabinovitch, M., *Professional and non-professional phagocytes: an introduction*. Trends Cell Biol, 1995. **5**(3): p. 85-7.
17. Ofek, I., et al., *Nonopsonic phagocytosis of microorganisms*. Annu Rev Microbiol, 1995. **49**: p. 239-76.
18. Aderem, A. and D.M. Underhill, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 593-623.
19. Ernst, J.D., *Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1998. **66**(4): p. 1277-81.

20. May, R.C. and L.M. Machesky, *Phagocytosis and the actin cytoskeleton*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 6): p. 1061-77.
21. Cox, D. and S. Greenberg, *Phagocytic signaling strategies: Fc(gamma)receptor-mediated phagocytosis as a model system*. Semin Immunol, 2001. **13**(6): p. 339-45.
22. Ravetch, J.V., *Fc receptors*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(1): p. 121-5.
23. Kiefer, F., et al., *The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc gamma receptor signaling in macrophages and neutrophils*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 4209-20.
24. Crowley, M.T., et al., *A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc gamma receptors on macrophages*. J Exp Med, 1997. **186**(7): p. 1027-39.
25. Matsuda, M., et al., *Abrogation of the Fc gamma receptor IIA-mediated phagocytic signal by stem-loop Syk antisense oligonucleotides*. Mol Biol Cell, 1996. **7**(7): p. 1095-106.
26. Raeder, E.M., et al., *Syk activation initiates downstream signaling events during human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis*. J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6785-93.
27. Greenberg, S., et al., *Clustered syk tyrosine kinase domains trigger phagocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(3): p. 1103-7.
28. Toker, A. and L.C. Cantley, *Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase*. Nature, 1997. **387**(6634): p. 673-6.
29. Singh, S.S., et al., *Activation of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **195**(1): p. 104-12.
30. Cox, D., et al., *A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 680-5.
31. Cox, D., et al., *A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension*. J Biol Chem, 1999. **274**(3): p. 1240-7.
32. Botelho, R.J., et al., *Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis*. J Cell Biol, 2000. **151**(7): p. 1353-68.
33. Lennartz, M.R., *Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(3-4): p. 415-30.
34. Sawyer, D.W., J.A. Sullivan, and G.L. Mandell, *Intracellular free calcium localization in neutrophils during phagocytosis*. Science, 1985. **230**(4726): p. 663-6.
35. Suchard, S.J., et al., *Mitogen-activated protein kinase activation during IgG-dependent phagocytosis in human neutrophils: inhibition by ceramide*. J Immunol, 1997. **158**(10): p. 4961-7.
36. Dempsey, E.C., et al., *Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(3): p. L429-38.
37. Karimi, K., T.R. Gemmill, and M.R. Lennartz, *Protein kinase C and a calcium-independent phospholipase are required for IgG-mediated phagocytosis by Mono-Mac-6 cells*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(6): p. 854-62.
38. Breton, A. and A. Descoteaux, *Protein kinase C-alpha participates in Fc gamma R-mediated phagocytosis in macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **276**(2): p. 472-6.
39. Ridley, A.J., *Rho proteins, PI 3-kinases, and monocyte/macrophage motility*. FEBS Lett, 2001. **498**(2-3): p. 168-71.

40. Dharmawardhane, S., et al., *Localization of p21-activated kinase 1 (PAK1) to pseudopodia, membrane ruffles, and phagocytic cups in activated human neutrophils*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(3): p. 521-7.
41. Edwards, D.C., et al., *Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(5): p. 253-9.
42. Arber, S., et al., *Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase*. Nature, 1998. **393**(6687): p. 805-9.
43. Edwards, D.C. and G.N. Gill, *Structural features of LIM kinase that control effects on the actin cytoskeleton*. J Biol Chem, 1999. **274**(16): p. 11352-61.
44. Downey, G.P., et al., *Importance of MEK in neutrophil microbicidal responsiveness*. J Immunol, 1998. **160**(1): p. 434-43.
45. Hiller, G. and R. Sundler, *Activation of arachidonate release and cytosolic phospholipase A2 via extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in macrophages stimulated by bacteria or zymosan*. Cell Signal, 1999. **11**(12): p. 863-9.
46. Karimi, K. and M.R. Lennartz, *Protein kinase C activation precedes arachidonic acid release during IgG-mediated phagocytosis*. J Immunol, 1995. **155**(12): p. 5786-94.
47. Gijon, M.A., et al., *Cytosolic phospholipase A2 is required for macrophage arachidonic acid release by agonists that Do and Do not mobilize calcium. Novel role of mitogen-activated protein kinase pathways in cytosolic phospholipase A2 regulation*. J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 20146-56.
48. Lennartz, M.R. and E.J. Brown, *Arachidonic acid is essential for IgG Fc receptor-mediated phagocytosis by human monocytes*. J Immunol, 1991. **147**(2): p. 621-6.
49. Kobayashi, K., K. Takahashi, and S. Nagasawa, *The role of tyrosine phosphorylation and Ca²⁺ accumulation in Fc gamma-receptor-mediated phagocytosis of human neutrophils*. J Biochem, 1995. **117**(6): p. 1156-61.
50. Della Bianca, V., M. Grzeskowiak, and F. Rossi, *Studies on molecular regulation of phagocytosis and activation of the NADPH oxidase in neutrophils. IgG- and C3b-mediated ingestion and associated respiratory burst independent of phospholipid turnover and Ca²⁺ transients*. J Immunol, 1990. **144**(4): p. 1411-7.
51. Pan, L. and P. Pei, *Signaling transduction by IgG receptors*. Chin Med J (Engl), 2003. **116**(4): p. 487-94.
52. Ravetch, J.V. and S. Bolland, *IgG Fc receptors*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 275-90.
53. Avalos, A.M., et al., *FcgammaRIIB regulation of BCR/TLR-dependent autoreactive B-cell responses*. Eur J Immunol, 2011. **40**(10): p. 2692-8.
54. Bolland, S., et al., *SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk*. Immunity, 1998. **8**(4): p. 509-16.
55. Huang, Z.Y., et al., *The effect of phosphatases SHP-1 and SHIP-1 on signaling by the ITIM- and ITAM-containing Fcgamma receptors FcgammaRIIB and FcgammaRIIA*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(6): p. 823-9.
56. Bruhns, P., et al., *Molecular basis of the recruitment of the SH2 domain-containing inositol 5-phosphatases SHIP1 and SHIP2 by fcgamma RIIB*. J Biol Chem, 2000. **275**(48): p. 37357-64.

57. Lesourne, R., et al., *Insufficient phosphorylation prevents fc gamma RIIB from recruiting the SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase SHP-1*. J Biol Chem, 2001. **276**(9): p. 6327-36.
58. McNew, J.A., et al., *Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 153-9.
59. Swanson, J.A., et al., *A contractile activity that closes phagosomes in macrophages*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 3): p. 307-16.
60. Sturgill-Koszycki, S., U.E. Schaible, and D.G. Russell, *Mycobacterium-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis*. Embo J, 1996. **15**(24): p. 6960-8.
61. Griffin, F.M., Jr., et al., *Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane*. J Exp Med, 1975. **142**(5): p. 1263-82.
62. Vidarsson, G. and J.G. van de Winkel, *Fc receptor and complement receptor-mediated phagocytosis in host defence*. Curr Opin Infect Dis, 1998. **11**(3): p. 271-8.
63. van der Pol, W. and J.G. van de Winkel, *IgG receptor polymorphisms: risk factors for disease*. Immunogenetics, 1998. **48**(3): p. 222-32.
64. Rascu, A., et al., *Clinical relevance of Fc gamma receptor polymorphisms*. Ann N Y Acad Sci, 1997. **815**: p. 282-95.
65. Deo, Y.M., et al., *Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc gamma R-directed immunotherapies*. Immunol Today, 1997. **18**(3): p. 127-35.
66. Metes, D., et al., *Ligand binding specificities and signal transduction pathways of Fc gamma receptor IIc isoforms: the CD32 isoforms expressed by human NK cells*. Eur J Immunol, 1999. **29**(9): p. 2842-52.
67. Chuang, F.Y., M. Sassaroli, and J.C. Unkeless, *Convergence of Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB signaling pathways in human neutrophils*. J Immunol, 2000. **164**(1): p. 350-60.
68. Van de Winkel, J.G., *The Immunoglobulin Receptors and their Physiological and Pathological Roles in Immunity*. Immunology and Medicine, 1998. **28**.
69. Wenink, M.H., et al., *Fc gamma receptor mediated modulation of dendritic cells as a potential strategy in the battle against rheumatoid arthritis*. Neth J Med, 2006. **64**(4): p. 103-8.
70. Keegan, A.D. and W.E. Paul, *Multichain immune recognition receptors: similarities in structure and signaling pathways*. Immunol Today, 1992. **13**(2): p. 63-8.
71. Mina-Osorio, P. and E. Ortega, *Signal regulators in FcR-mediated activation of leukocytes?* Trends Immunol, 2004. **25**(10): p. 529-35.
72. Boucheix, C. and E. Rubinstein, *Tetraspanins*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(9): p. 1189-205.
73. Hemler, M.E., *Specific tetraspanin functions*. J Cell Biol, 2001. **155**(7): p. 1103-7.
74. Banerjee, S.A., M. Hadjiargyrou, and P.H. Patterson, *An antibody to the tetraspan membrane protein CD9 promotes neurite formation in a partially alpha3beta1 integrin-dependent manner*. J Neurosci, 1997. **17**(8): p. 2756-65.
75. Worthington, R.E., R.C. Carroll, and C. Boucheix, *Platelet activation by CD9 monoclonal antibodies is mediated by the Fc gamma II receptor*. Br J Haematol, 1990. **74**(2): p. 216-22.
76. Kaji, K., et al., *Functional association of CD9 with the Fc gamma receptors in macrophages*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3256-65.

77. Roberts, J.J., et al., *Platelet activation induced by a murine monoclonal antibody directed against a novel tetra-span antigen*. Br J Haematol, 1995. **89**(4): p. 853-60.
78. Gil, M.L., et al., *A member of the tetra spans transmembrane protein superfamily is recognized by a monoclonal antibody raised against an HLA class I-deficient, lymphokine-activated killer-susceptible, B lymphocyte line. Cloning and preliminary functional studies*. J Immunol, 1992. **148**(9): p. 2826-33.
79. Ulyanova, T., et al., *The sialoadhesin CD33 is a myeloid-specific inhibitory receptor*. Eur J Immunol, 1999. **29**(11): p. 3440-9.
80. Braesch-Andersen, S. and I. Stamenkovic, *Sialylation of the B lymphocyte molecule CD22 by alpha 2,6-sialyltransferase is implicated in the regulation of CD22-mediated adhesion*. J Biol Chem, 1994. **269**(16): p. 11783-6.
81. Varki, A., *Sialic acids as ligands in recognition phenomena*. Faseb J, 1997. **11**(4): p. 248-55.
82. Dietrich, J., H. Nakajima, and M. Colonna, *Human inhibitory and activating Ig-like receptors which modulate the function of myeloid cells*. Microbes Infect, 2000. **2**(3): p. 323-9.
83. Cella, M., et al., *A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing*. J Exp Med, 1997. **185**(10): p. 1743-51.
84. Colonna, M., et al., *Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules*. J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3096-100.
85. Colonna, M., et al., *A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells*. J Exp Med, 1997. **186**(11): p. 1809-18.
86. Nakajima, H., et al., *Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain*. J Immunol, 1999. **162**(1): p. 5-8.
87. van Beek, E.M., et al., *Signal regulatory proteins in the immune system*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 7781-7.
88. Oldenborg, P.A., H.D. Gresham, and F.P. Lindberg, *CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) regulates Fc gamma and complement receptor-mediated phagocytosis*. J Exp Med, 2001. **193**(7): p. 855-62.
89. MacIntyre, E.A., et al., *Activation of human monocytes occurs on cross-linking monocytic antigens to an Fc receptor*. J Immunol, 1989. **142**(7): p. 2377-83.
90. Rubinstein, E., et al., *Fc gamma receptor-mediated interplatelet activation by a monoclonal antibody against beta 2 microglobulin*. J Immunol, 1991. **147**(9): p. 3040-6.
91. Anderson, G.P., J.G. van de Winkel, and C.L. Anderson, *Anti-GPIIb/IIIa (CD41) monoclonal antibody-induced platelet activation requires Fc receptor-dependent cell-cell interaction*. Br J Haematol, 1991. **79**(1): p. 75-83.
92. Butchar, J.P., et al., *Reciprocal regulation of activating and inhibitory Fc{gamma} receptors by TLR7/8 activation: implications for tumor immunotherapy*. Clin Cancer Res, 2011. **16**(7): p. 2065-75.
93. Cooper, P.H., P. Mayer, and M. Baggiolini, *Stimulation of phagocytosis in bone marrow-derived mouse macrophages by bacterial lipopolysaccharide: correlation with biochemical and functional parameters*. J Immunol, 1984. **133**(2): p. 913-22.

94. Okamoto, F., et al., *Leukotriene B4 augments and restores Fc gammaRs-dependent phagocytosis in macrophages*. J Biol Chem, 2011. **285**(52): p. 41113-21.
95. Gao, H., et al., *Effects of the protein tyrosine phosphatase CD45 on Fc gammaRIIa signaling and neutrophil function*. Exp Hematol, 2000. **28**(9): p. 1062-70.
96. Corvaia, N., et al., *Modulation of Fc gamma receptor-mediated early events by the tyrosine phosphatase CD45 in primary human monocytes. Consequences for interleukin-6 production*. Eur J Immunol, 1995. **25**(3): p. 738-44.
97. Rankin, B.M., et al., *Stimulation of tyrosine phosphorylation and calcium mobilization by Fc gamma receptor cross-linking. Regulation by the phosphotyrosine phosphatase CD45*. J Immunol, 1993. **150**(2): p. 605-16.
98. Hundt, M. and R.E. Schmidt, *Functional characterization of receptor-type protein tyrosine phosphatase CD148 (HPTP eta/DEP-1) in Fc gamma receptor IIa signal transduction of human neutrophils*. Eur J Immunol, 1997. **27**(12): p. 3532-5.
99. Riemann, D., A. Kehlen, and J. Langner, *CD13--not just a marker in leukemia typing*. Immunol Today, 1999. **20**(2): p. 83-8.
100. Olsen, J., et al., *Complete amino acid sequence of human intestinal aminopeptidase N as deduced from cloned cDNA*. FEBS Lett, 1988. **238**(2): p. 307-14.
101. Watt, V.M. and H.F. Willard, *The human aminopeptidase N gene: isolation, chromosome localization, and DNA polymorphism analysis*. Hum Genet, 1990. **85**(6): p. 651-4.
102. O'Connell, P.J., V. Gerkis, and A.J. d'Apice, *Variable O-glycosylation of CD13 (aminopeptidase N)*. J Biol Chem, 1991. **266**(7): p. 4593-7.
103. Mina-Osorio, P., *The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target*. Trends Mol Med, 2008. **14**(8): p. 361-71.
104. Favalaro, E.J., T. Browning, and D. Facey, *CD13 (GP150; aminopeptidase-N): predominant functional activity in blood is localized to plasma and is not cell-surface associated*. Exp Hematol, 1993. **21**(13): p. 1695-701.
105. van Hensbergen, Y., et al., *Soluble aminopeptidase N/CD13 in malignant and nonmalignant effusions and intratumoral fluid*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(12): p. 3747-54.
106. Dimitriu-Bona, A., R.J. Winchester, and G.R. Burmester, *Human mononuclear phagocytes differentiation antigens*. Adv Exp Med Biol, 1982. **155**: p. 423-7.
107. Shimizu, T., et al., *CD13/aminopeptidase N-induced lymphocyte involvement in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(9): p. 2330-8.
108. Menrad, A., et al., *Biochemical and functional characterization of aminopeptidase N expressed by human melanoma cells*. Cancer Res, 1993. **53**(6): p. 1450-5.
109. Carl-McGrath, S., et al., *The ectopeptidases CD10, CD13, CD26, and CD143 are upregulated in gastric cancer*. Int J Oncol, 2004. **25**(5): p. 1223-32.
110. Favalaro, E.J., et al., *Aminopeptidase-N (CD13; gp 150): contrasting patterns of enzymatic activity in blood from patients with myeloid or lymphoid leukemia*. Leuk Res, 1995. **19**(9): p. 659-66.
111. Fujii, H., et al., *Human melanoma invasion and metastasis enhancement by high expression of aminopeptidase N/CD13*. Clin Exp Metastasis, 1995. **13**(5): p. 337-44.
112. Petrovic, N., et al., *CD13/APN regulates endothelial invasion and filopodia formation*. Blood, 2007. **110**(1): p. 142-50.

113. Saiki, I., et al., *Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation*. Int J Cancer, 1993. **54**(1): p. 137-43.
114. Mishima, Y., et al., *Leukemic cell-surface CD13/aminopeptidase N and resistance to apoptosis mediated by endothelial cells*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(13): p. 1020-8.
115. Tsukamoto, H., et al., *Aminopeptidase N (APN)/CD13 inhibitor, Ubenimex, enhances radiation sensitivity in human cervical cancer*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 74.
116. Bogenrieder, T., et al., *Expression and localization of aminopeptidase A, aminopeptidase N, and dipeptidyl peptidase IV in benign and malignant human prostate tissue*. Prostate, 1997. **33**(4): p. 225-32.
117. Riemann, D., A. Kehlen, and J. Langner, *Stimulation of the expression and the enzyme activity of aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 on human renal cell carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by T cell-derived cytokines, such as IL-4 and IL-13*. Clin Exp Immunol, 1995. **100**(2): p. 277-83.
118. van Hal, P.T., et al., *Potential indirect anti-inflammatory effects of IL-4. Stimulation of human monocytes, macrophages, and endothelial cells by IL-4 increases aminopeptidase-N activity (CD13; EC 3.4.11.2)*. J Immunol, 1994. **153**(6): p. 2718-28.
119. Kanayama, N., et al., *Inactivation of interleukin-8 by aminopeptidase N (CD13)*. J Leukoc Biol, 1995. **57**(1): p. 129-34.
120. Yang, E., et al., *Aminopeptidase N/CD13 induces angiogenesis through interaction with a pro-angiogenic protein, galectin-3*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **363**(2): p. 336-41.
121. Padia, S.H., et al., *Intrarenal aminopeptidase N inhibition restores defective angiotensin II type 2-mediated natriuresis in spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 2011. **55**(2): p. 474-80.
122. Bauvois, B., *Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis?* Oncogene, 2004. **23**(2): p. 317-29.
123. Rangel, R., et al., *Impaired angiogenesis in aminopeptidase N-null mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(11): p. 4588-93.
124. Mishima, Y., et al., *Continuous treatment of bestatin induces anti-angiogenic property in endothelial cells*. Cancer Sci, 2007. **98**(3): p. 364-72.
125. Ichinose, Y., et al., *Randomized double-blind placebo-controlled trial of bestatin in patients with resected stage I squamous-cell lung carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(8): p. 605-10.
126. Terauchi, M., et al., *Inhibition of APN/CD13 leads to suppressed progressive potential in ovarian carcinoma cells*. BMC Cancer, 2007. **7**: p. 140.
127. Haraguchi, N., et al., *CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells*. J Clin Invest, 2011. **120**(9): p. 3326-39.
128. Danziger, R.S., *Aminopeptidase N in arterial hypertension*. Heart Fail Rev, 2008. **13**(3): p. 293-8.
129. Zini, S., et al., *Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11968-73.

130. Tani, K., et al., *CD13/aminopeptidase N, a novel chemoattractant for T lymphocytes in pulmonary sarcoidosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(5): p. 1636-42.
131. Huang, L., et al., *Role of CD13/aminopeptidase N in rat lymphocytic alveolitis caused by thoracic irradiation*. Radiat Res, 2002. **157**(2): p. 191-8.
132. Santos, A.N., et al., *Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes*. Cell Immunol, 2000. **201**(1): p. 22-32.
133. Goding, J.W., *Ecto-enzymes: physiology meets pathology*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(3): p. 285-311.
134. Proost, P., et al., *Proteolytic processing of CXCL11 by CD13/aminopeptidase N impairs CXCR3 and CXCR7 binding and signaling and reduces lymphocyte and endothelial cell migration*. Blood, 2007. **110**(1): p. 37-44.
135. Wulfaenger, J., et al., *Aminopeptidase N (APN)/CD13-dependent CXCR4 downregulation is associated with diminished cell migration, proliferation and invasion*. Mol Membr Biol, 2008. **25**(1): p. 72-82.
136. Chang, Y.W., et al., *CD13 (aminopeptidase N) can associate with tumor-associated antigen L6 and enhance the motility of human lung cancer cells*. Int J Cancer, 2005. **116**(2): p. 243-52.
137. Saitoh, Y., et al., *A derivative of aminopeptidase inhibitor (BE15) has a dual inhibitory effect of invasion and motility on tumor and endothelial cells*. Biol Pharm Bull, 2006. **29**(4): p. 709-12.
138. Subiran, N., et al., *Expression of enkephalin-degrading enzymes in human semen and implications for sperm motility*. Fertil Steril, 2008. **89**(5 Suppl): p. 1571-7.
139. Irazusta, J., et al., *Enkephalin-degrading enzymes in normal and subfertile human semen*. J Androl, 2004. **25**(5): p. 733-9.
140. Larsen, S.L., et al., *T cell responses affected by aminopeptidase N (CD13)-mediated trimming of major histocompatibility complex class II-bound peptides*. J Exp Med, 1996. **184**(1): p. 183-9.
141. Rock, K.L., I.A. York, and A.L. Goldberg, *Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 670-7.
142. Woodhead, V.E., et al., *Novel molecular mechanisms of dendritic cell-induced T cell activation*. Int Immunol, 2000. **12**(7): p. 1051-61.
143. Imamura, N. and A. Kimura, *Effect of ubenimex (Bestatin) on the cell growth and phenotype of HL-60 and HL-60R cell lines: up-and down-regulation of CD13/aminopeptidase N*. Leuk Lymphoma, 2000. **37**(5-6): p. 663-7.
144. Inoi, K., et al., *Aminopeptidase inhibitor ubenimex (bestatin) inhibits the growth of human choriocarcinoma in nude mice through its direct cytostatic activity*. Anticancer Res, 1995. **15**(5B): p. 2081-7.
145. Sakuraya, M., et al., *Aminopeptidase inhibitor ubenimex inhibits the growth of leukaemic cell lines and myeloma cells through its cytotoxicity*. J Int Med Res, 2000. **28**(5): p. 214-21.
146. Lendeckel, U., et al., *Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (review)*. Int J Mol Med, 1999. **4**(1): p. 17-27.
147. Wex, T., et al., *Antisense-mediated inhibition of aminopeptidase N (CD13) markedly decreases growth rates of hematopoietic tumour cells*. Adv Exp Med Biol, 1997. **421**: p. 67-73.

148. Murata, M., et al., *Effect of ubenimex on the proliferation and differentiation of U937 human histiocytic lymphoma cells*. *Leukemia*, 1994. **8**(12): p. 2188-93.
149. Mina-Osorio, P., L.H. Shapiro, and E. Ortega, *CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells*. *J Leukoc Biol*, 2006. **79**(4): p. 719-30.
150. Mina-Osorio, P., et al., *CD13 is a novel mediator of monocytic/endothelial cell adhesion*. *J Leukoc Biol*, 2008. **84**(2): p. 448-59.
151. Soderberg, C., et al., *CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection*. *J Virol*, 1993. **67**(11): p. 6576-85.
152. Nomura, R., et al., *Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae*. *J Virol*, 2004. **78**(16): p. 8701-8.
153. Tusell, S.M., S.A. Schittone, and K.V. Holmes, *Mutational analysis of aminopeptidase N, a receptor for several group 1 coronaviruses, identifies key determinants of viral host range*. *J Virol*, 2007. **81**(3): p. 1261-73.
154. Kolb, A.F., et al., *Molecular analysis of the coronavirus-receptor function of aminopeptidase N*. *Adv Exp Med Biol*, 1998. **440**: p. 61-7.
155. Watanabe, S., *[The receptor and pathways for human cytomegalovirus entry]*. *Nippon Rinsho*, 1998. **56**(1): p. 44-9.
156. Offner, G.D., D. Gong, and N.H. Afdhal, *Identification of a 130-kilodalton human biliary concanavalin A binding protein as aminopeptidase N*. *Gastroenterology*, 1994. **106**(3): p. 755-62.
157. Nunez, L., et al., *Cholesterol crystallization-promoting activity of aminopeptidase-N isolated from the vesicular carrier of biliary lipids*. *FEBS Lett*, 1993. **329**(1-2): p. 84-8.
158. Kawai, M., Y. Otake, and Y. Hara, *High-molecular-mass isoform of aminopeptidase N/CD13 in serum from cholestatic patients*. *Clin Chim Acta*, 2003. **330**(1-2): p. 141-9.
159. Kramer, W., et al., *Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(2): p. 1306-20.
160. Orso, E., et al., *Ezetimib influences the expression of raft-associated antigens in human monocytes*. *Cytometry A*, 2006. **69**(3): p. 206-8.
161. Tokuda, N. and R.B. Levy, *1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulates phagocytosis but suppresses HLA-DR and CD13 antigen expression in human mononuclear phagocytes*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1996. **211**(3): p. 244-50.
162. Mina-Osorio, P. and E. Ortega, *Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγR3 in human monocytes*. *J Leukoc Biol*, 2005. **77**(6): p. 1008-17.
163. Danielsen, E.M. and B. van Deurs, *Galectin-4 and small intestinal brush border enzymes form clusters*. *Mol Biol Cell*, 1997. **8**(11): p. 2241-51.
164. Ishimaru, Y., et al., *Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(33): p. 12569-74.
165. Ghanta, K.S., et al., *MTA1 coregulation of transglutaminase 2 expression and function during inflammatory response*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(9): p. 7132-8.
166. Shi, L., et al., *[The effect of lipopolysaccharide on the expression and activity of Toll-like receptor 4 in mesenchymal stem cells]*. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2007. **28**(12): p. 828-31.

167. Ray, A., P. Karmakar, and T. Biswas, *Up-regulation of CD80-CD86 and IgA on mouse peritoneal B-1 cells by porin of Shigella dysenteriae is Toll-like receptors 2 and 6 dependent*. Mol Immunol, 2004. **41**(12): p. 1167-75.
168. Gabrilovac, J., et al., *Expression, regulation and functional activities of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2; APN; CD13) on murine macrophage J774 cell line*. Immunobiology, 2011. **216**(1-2): p. 132-44.
169. van Zandbergen, G., et al., *Crosslinking of the human Fc receptor for IgA (FcalphaRI/CD89) triggers FcR gamma-chain-dependent shedding of soluble CD89*. J Immunol, 1999. **163**(11): p. 5806-12.
170. Haas, K.M., J.C. Poe, and T.F. Tedder, *CD21/35 promotes protective immunity to Streptococcus pneumoniae through a complement-independent but CD19-dependent pathway that regulates PD-1 expression*. J Immunol, 2009. **183**(6): p. 3661-71.
171. Hurley, R.W., et al., *Monoclonal antibody crosslinking of the alpha 4 or beta 1 integrin inhibits committed clonogenic hematopoietic progenitor proliferation*. Exp Hematol, 1997. **25**(4): p. 321-8.
172. Leyton, L., A.F. Quest, and C. Bron, *Thy-1/CD3 coengagement promotes TCR signaling and enhances particularly tyrosine phosphorylation of the raft molecule LAT*. Mol Immunol, 1999. **36**(11-12): p. 755-68.
173. Adams, C., et al., *Structural and functional analysis of the interaction between the agonistic monoclonal antibody Apomab and the proapoptotic receptor DR5*. Cell Death Differ, 2008. **15**(4): p. 751-61.
174. Ackerman, M.E., et al., *A robust, high-throughput assay to determine the phagocytic activity of clinical antibody samples*. J Immunol Methods. **366**(1-2): p. 8-19.
175. Pluta, K. and M.M. Kacprzak, *Use of HIV as a gene transfer vector*. Acta Biochim Pol, 2009. **56**(4): p. 531-95.
176. Singer, O. and I.M. Verma, *Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis*. Curr Gene Ther, 2008. **8**(6): p. 483-8.
177. Manjunath, N., et al., *Lentiviral delivery of short hairpin RNAs*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(9): p. 732-45.
178. Wienholds, E. and R.H. Plasterk, *MicroRNA function in animal development*. FEBS Lett, 2005. **579**(26): p. 5911-22.