



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Obtención y caracterización de líneas celulares que expresan los
diferentes receptores Fc gamma humanos**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

Ricardo Muñoz Godinez

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Carlos Rosales Ledezma
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

COMITÉ TUTOR: Dra. Gladis Del Carmen Fragoso González
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Dra. Diana Elodia Aguilar León
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán

México, D.F. Septiembre. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Obtención y caracterización de líneas celulares que expresan los
diferentes receptores Fc gamma humanos**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

Ricardo Muñoz Godinez

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Carlos Rosales Ledezma
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

COMITÉ TUTOR: Dra. Gladis Del Carmen Fragoso González
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Dra. Diana Elodia Aguilar León
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán

México, D.F. Septiembre. 2015



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 29 de junio del 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **MUÑOZ GODINEZ RICARDO** con número de cuenta 304262014 con la tesis titulada "Obtención y caracterización de líneas celulares que expresen los diferentes receptores Fc gamma humanos", realizada bajo la dirección del **DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA**:

Presidente: Dr. Ricardo Lascurain Ledesma
Vocal: Dr. Julio César Carrero Sánchez
Secretario: Dra. Diana Elodia Aguilar León
Suplente: Dr. Luis Felipe Jiménez García
Suplente: Dra. Gladis del Carmen Fragozo González

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de agosto del 2015.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

- 1.- Principalmente agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

- 2.- Este trabajo de tesis se realizó en el laboratorio del Dr. Carlos Rosales Ledezma, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con apoyo del Proyecto 168098 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y del Proyecto IN207514 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM. A los cuales agradezco el apoyo. Principalmente agradezco a CONACyT por la beca recibida durante la maestría.

- 3.- Agradezco mi tutor principal Dr. Carlos Rosales Ledezma por el tiempo dedicado, las enseñanzas y consejos para la realización del proyecto. También agradezco a los miembros de mi comité tutor, a la Dra Gladis Del Carmen Fragoso González y la Dra. Diana Elodia Aguilar León por el tiempo dedicado en cada reunión y las sugerencias para mejorar el proyecto.

Agradecimientos personales

Quiero agradecer a la técnico académico del laboratorio M en I.B.B. Nancy Yorley Mora Pérez por la ayuda y consejos para la realización del proyecto.

Así como a los miembros de mi jurado al Dr. Ricardo Lascurain Ledesma, Dr. Julio César Carrero Sánchez y al Dr. Luis Felipe Jiménez García por el tiempo dedicado a las correcciones de este trabajo.

También agradezco a mis compañeros del laboratorio Fernando Gutiérrez y Rafael Alemán por hacer tan ameno el tiempo de trabajo.

Índice

| Contenido | Página |
|--|---------------|
| Resumen | 1 |
| Resumen en inglés (Abstract) | 2 |
| Introducción | 3 |
| 1.- Los receptores Fc | 4 |
| 1.1.- Expresión de los diferentes receptores Fc gamma en leucocitos | 6 |
| 1.2.- Señalización de activación por parte de los receptores Fc gamma | 7 |
| 1.3.- Señalización de inhibición por parte de los receptores Fc gamma | 8 |
| 2.- Neutrófilos | 9 |
| 2.1.- Receptores de membrana en Neutrófilos | 10 |
| 2.2.- Receptores Fc gamma y su señalización en neutrófilos | 10 |
| 3.- La vía de las MAPK | 13 |
| 3.1.- MAPK en la respuesta inmune | 15 |
| 4.- NF- κ B | 15 |
| 4.1.- La vía de NF- κ B en la respuesta inmune | 16 |
| 5.- Movilización de Ca ²⁺ intracelular | 18 |
| Planteamiento del problema | 21 |
| Hipótesis | 22 |
| Objetivos | 23 |
| Material y métodos | 24 |
| Células | 24 |
| Obtención de los plásmidos con el inserto Fc γ RIIA, Fc γ RIIB o Fc γ RIIIB | 24 |
| Transformación de bacterias | 25 |

| | |
|--|----|
| Miniprep | 26 |
| Maxiprep | 26 |
| Electroforesis de DNA en geles de agarosa | 27 |
| Transfección con lipofectamina 2000 | 27 |
| Transfección de células con Nucleofector (Amaxa inc) | 27 |
| Inmunofluorescencia para detectar la expresión de los receptores en las células transfectadas mediante citometría de flujo | 27 |
| Cultivo y cuidado de las células transfectadas | 28 |
| Movilización de Ca ²⁺ intracelular | 28 |
| Medición de la activación de NF-κB por citometría de flujo | 28 |
| Estimulación de las células a través de los receptores Fc | 29 |
| Western Blot | 29 |
| Resultados | 31 |
| Obtención de células NIH3T3 (Fibroblastos de ratón) transfectadas con el receptor FcγRIIA o el receptor FcγRIIB | 31 |
| Construcción de un plásmido que contenga el cDNA que codifique para el receptor FcγRIIB | 39 |
| Transfección de células NIH3T3 con FcγRIIB utilizando nucleofector | 45 |
| Obtención de monocitos (THP-1) que expresen el receptor FcγRIIB | 48 |
| Funcionalidad del receptor FcγRIIB en células THP-1 | 50 |
| Movilización de Ca ²⁺ intracelular estimulando el receptor FcγRIIB en THP-1 transfectadas | 50 |
| Western Blot de células THP-1 transfectadas con FcγRIIB para identificar pERK | 53 |
| Estimulación del receptor FcγRIIB en THP-1 para medir activación de NF-κB utilizando FACS | 56 |
| Discusión | 58 |

Conclusiones

61

Referencias

62

Resumen

Los receptores Fc contribuyen a las funciones de protección del sistema inmunológico cuando reconocen a los anticuerpos IgG, IgA e IgE que se encuentran unidos a células infectadas o a un antígeno. Los receptores que se unen al dominio Fc de IgG se nombran receptores Fc gamma (FcγR). En los seres humanos existen tres clases de FcγR. FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16). Dentro de las respuestas que inducen los receptores Fcγ al interactuar con sus anticuerpos específicos se incluyen la fagocitosis, la generación de estallido respiratorio, la activación de factores nucleares y la producción de mediadores inflamatorios y citocinas. Para activar estas respuestas celulares los receptores accionan diferentes vías de señal dentro de la célula y así lograr neutralizar al antígeno.

Es importante estudiar a los receptores Fc de forma individual para poder evaluar cuáles son las vías de señalización que despeña cada uno en la respuesta inmune. Es por esto que resulta de nuestro interés obtener líneas celulares que expresen los receptores FcγRIIA, FcγRIIB o FcγRIIIB. Para esto nos propusimos como objetivo la expresión artificial del receptor FcγRIIIB en monocitos (THP-1), demostrando la funcionalidad del receptor en dicha línea celular. Así como la expresión artificial de los receptores FcγRIIA o FcγRIIB en fibroblastos de ratón.

Para esto se transfectaron células NIH3T3 con los cDNAs que codifican para los receptores FcγRIIA o FcγRIIB posteriormente la presencia del receptor en la membrana de las células NIH3T3 se determinó por citometría de flujo dando resultados positivos para ambos receptores. Así mismo, se transfectaron células THP-1 con un plásmido que contiene el cDNA que codifica para el receptor FcγRIIIB y la presencia del receptor FcγRIIIB en las THP-1 se determinó por citometría de flujo, dando resultados positivos. Para determinar si las células THP-1 mantienen funcional el receptor, se realizaron diferentes ensayos en los que se ha visto que participa el receptor FcγRIIIB en neutrófilos. Los resultados fueron que el receptor FcγRIIIB además de estar presente en las células THP-1 es funcional, ya que responde a los estímulos extracelulares resultando en la activación de una vía de señalización para la respuesta celular que corresponda.

Observamos que la técnica de electroporación con Nucleofector es más eficiente. Los resultados también demuestran que las células transfectadas no pierden la expresión, contrariamente; se observa un aumento en la expresión del receptor tal como lo indican otros autores. Se realizaron ensayos de movilización de Ca^{2+} intracelular, pero con esto no se demostró la funcionalidad del receptor FcγRIIIB. No obstante, con los ensayos de detección de pERK y activación de NF-κB si se demostró la funcionalidad del receptor FcγRIIIB en las células THP-1, haciendo interesante el hecho de que no observamos movilización de Ca^{2+} intracelular ya que se ha observado que en neutrófilos este receptor si moviliza Ca^{2+} . Esto deja lugar a futuras investigaciones.

Abstract

Fc receptors contribute to the protective functions of the immune system to recognize when IgG, IgA and IgE antibodies that are attached to infected cells or an antigen. The receptors that bind the Fc domain of IgG Fc gamma (Fc γ R) receptors are named. In humans there are three kinds of Fc γ R. Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) and Fc γ RIII (CD16). In inducing responses to Fc γ receptors interact with specific antibodies phagocytosis, respiratory burst generation, activation of nuclear factors and the production of inflammatory mediators and cytokines are included. To activate these receptors trigger cellular responses different signaling pathways within the cell and achieve neutralize antigen.

It is important to study the Fc receptors individually to assess what signaling pathways that plunges everyone in the immune response are. That is why it is in our interest to obtain cell lines expressing the Fc γ RIIA, Fc γ RIIB or Fc γ RIIIB receivers. To this aim we set the Fc γ RIIIB artificial receptor expression in monocytes (THP-1) demonstrating the functionality of the receptor in said cell line. As well as artificial expression of the Fc γ RIIA or Fc γ RIIB receptors in mouse fibroblasts.

To this NIH3T3 cells with cDNAs encoding the Fc γ RIIA or Fc γ RIIB receptor subsequently the presence of the receptor in the membrane of NIH3T3 cells was determined by flow cytometry positive results for both receptors were transfected. Thus mime, THP-1 cells were transfected with a plasmid containing the cDNA encoding the receptor and Fc γ RIIIB Fc γ RIIIB receptor present on THP-1 was determined by flow cytometry, yielding positive results. To determine whether the THP-1 cells maintain the functional receptor, different tests in which has been Fc γ RIIIB receptor that participates in neutrophils were performed. The results were that the Fc γ RIIIB receptor is also present in THP-1 cells is functional, as it responds to extracellular stimuli resulting in the activation of a signaling pathway for the appropriate cellular response.

We note that the technique of electroporation with Nucleofector is more efficient. The results also demonstrate that the transfected cells do not lose the expression, contrary; an increase in receptor expression as shown by other authors observed. Mobilization assays were performed intracellular Ca²⁺, but this functionality is not demonstrated Fc γ RIIIB receiver. However, the detection assays pERK and activation of NF-kB if the functionality of Fc γ RIIIB receptor on THP-1 cells was demonstrated by Interestingly, we did not observe mobilization of intracellular Ca²⁺ as has been observed in neutrophil this receiver if it mobilizes Ca²⁺. This leaves room for future research.

Introducción

Los receptores Fc específicos para anticuerpos IgG, IgA e IgE son glicoproteínas que se encuentran en la superficie de los leucocitos especializados del sistema inmunológico, incluyendo monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas, mastocitos, células B y T citotóxicos activados, basófilos y células NK. Los receptores Fc contribuyen a las funciones de protección del sistema inmunológico cuando reconocen a los anticuerpos IgG, IgA e IgE que se encuentran unidos a células infectadas o a un antígeno (1).

Por su parte los anticuerpos son proteínas del tipo inmunoglobulinas (Ig) producidos por los linfocitos B en respuesta a un antígeno propio o extraño reconocido por el sistema inmunológico (2). Los anticuerpos están compuestos de dos cadenas pesadas idénticas y de dos cadenas ligeras idénticas, ambas unidas por puentes de disulfuro. Los anticuerpos tienen dos funciones principales: 1) unirse a un antígeno mediante su región Fab (fragmento de unión al antígeno) y 2) Mediar funciones efectoras para neutralizar o eliminar al antígeno mediante su parte carboxilo terminal Fc (fragmento cristizable) (3). La segunda función es posible debido a que los anticuerpos son reconocidos por los receptores Fc de los leucocitos y desencadenan a través de los receptores una vía de señalización para neutralizar al antígeno (1). Los receptores que se unen al dominio Fc de IgG se nombran receptores Fc gamma (Fc γ R) (4).

La activación de los receptores Fc γ estimula a células fagocíticas o citotóxicas. Los neutrófilos y los macrófagos y las células dendríticas ingieren y destruyen a los antígenos propios y extraños recubiertos de IgG a través del proceso de fagocitosis (mecanismo por el cual la mayoría de los antígenos son eliminados) (1). Dentro de las respuestas en muchas células del sistema inmunológico que inducen los receptores Fc γ al interactuar con sus anticuerpos específicos se incluyen fagocitosis, citotoxicidad dependiente de anticuerpos, la generación de estallido respiratorio, degranulación y producción de mediadores inflamatorios y citocinas (1). Para activar estas respuestas celulares los receptores prenden diferentes vías dentro de la célula, en las cuales están la movilización de calcio intracelular, activación de la MAPK y activación de factores nucleares como NF- κ B.

Estos receptores Fc gamma son una familia de glicoproteínas que se componen de una subunidad α de unión a IgG, que por lo general se empareja con cadenas γ accesorias, las cuales son importantes para la señalización del receptor. Cada cadena γ contiene residuos de tirosina en su región citoplasmica, que son fosforilados cuando se activa el receptor. Estos residuos de tirosina se encuentran dentro de secuencias de aminoácidos llamadas ITAM (del inglés: immunoreceptor tyrosine-based activation motif) en la región citoplasmática. Cabe mencionar que existe un receptor Fc (Fc γ RIIB) que en su región citoplasmática tiene una secuencia llamada ITIM (del inglés: immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) la cual inhibe la respuesta para atacar al antígeno o patógeno (4 - 6).

En los seres humanos existen tres clases de Fc γ R. Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), y Fc γ RIII (CD16). Estos receptores están codificados por genes diferentes y difieren en su avididad relativa de IgG, la estructura molecular y la distribución celular (4).

Debido a que la activación de las células fagocíticas es el mecanismo por el cual la mayoría de los patógenos son finalmente eliminados, existe un gran interés en descubrir las señales bioquímicas que los receptores Fc inducen en las células para activar sus funciones. Una de estas células son los neutrófilos (1). En los mamíferos los neutrófilos son los leucocitos circulantes más abundantes. Al inicio de un proceso de inflamación los neutrófilos son reclutados rápidamente al sitio de la infección, donde actúan como la primera línea de defensa contra el patógeno invasor. También se requiere que los neutrófilos sean activados a través de receptores de membrana para iniciar varios mecanismos de defensa como son la fagocitosis, el estallido respiratorio, la liberación de varias moléculas microbicidas por degranulación y la producción de citocinas proinflamatorias y movilización de calcio intracelular (6).

Ya que los neutrófilos son células de vida corta en contraste con otros leucocitos, por mucho tiempo se ha pensado que estas células no presentan regulación transcripcional. Sin embargo la inhibición de la apoptosis es una función de los neutrófilos regulada a nivel transcripcional (6,7). Los neutrófilos mueren en poco tiempo por apoptosis, a menos que se activen a través de diversos receptores de membrana durante el proceso inflamatorio (6,7). En muchos tipos celulares el factor nuclear κ B (NF- κ B) es requerido para el control transcripcional de producción de citocinas y es también central en la regulación en la sobrevivencia celular y apoptosis. Es por eso que en respuesta a varios estímulos inflamatorios los neutrófilos activan varios genes dependientes de NF- κ B como son la producción de interleucina (IL)-1, IL-12, IL-8 e IL-6.

1.- Los receptores Fc

Los microorganismos que causan enfermedad en seres humanos y animales entran al cuerpo en diferentes sitios y producen síntomas de la enfermedad mediante diversos mecanismos. Muchos agentes infecciosos pueden dañar tejidos. Estos agentes se denominan microorganismos patógenos o patógenos. En vertebrados, la invasión microbiana inicialmente es contrarrestada por defensas innatas que preexisten en todos los individuos y empiezan a actuar en el transcurso de minutos luego del encuentro con el agente infeccioso. Sólo cuando las defensas innatas del hospedero se superan, es necesaria una respuesta inmunitaria adaptativa. Por tanto existen dos tipos de respuesta inmune contra los agentes infecciosos, la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa (3, 8).

Así mismo existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas, denominadas inmunidad humoral e inmunidad celular. La inmunidad celular está mediada por las células T (linfocitos T). Por otra parte la inmunidad humoral es la que está mediada por los anticuerpos que son producidos por los linfocitos B (9). Los linfocitos B para, combatir con eficacia la amplia gama de agentes patógenos secretan anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig). Las IgG por su parte son una de las

proteínas más abundantes en el suero de los humanos, aproximadamente del 10 al 20% de las proteínas del plasma (10). Estos anticuerpos se producen en una vasta gama de especificidades contra antígenos. Sin embargo, todos los anticuerpos comparten características estructurales similares que les permiten unirse a receptores en las células efectoras (2,3).

Existen varias clases de receptores para anticuerpos. Un grupo de ocho genes en el cromosoma 1q que codifica para diversos receptores Fc que reconocen diferentes tipos de Ig (11). Por tanto, existen varias clases de receptores para la parte Fc de los anticuerpos, dependiendo la clase de inmunoglobulina que reconocen. Los receptores que se unen a IgG se conocen como receptores Fc gamma ($Fc\gamma R$), los receptores que reconocen IgA se conocen como receptores Fc alfa ($Fc\alpha R$) y los receptores para IgE se conocen como receptores Fc épsilon ($Fc\epsilon R$) (1).

En humanos tres clases de $Fc\gamma R$ han sido identificados, $Fc\gamma RI$ (CD64), $Fc\gamma RII$ (CD32) y $Fc\gamma RIII$ (CD16) (figura1). Todos estos receptores son proteínas que pertenecen a la superfamilia de las moléculas tipo inmunoglobulina (Ig) (1,4).

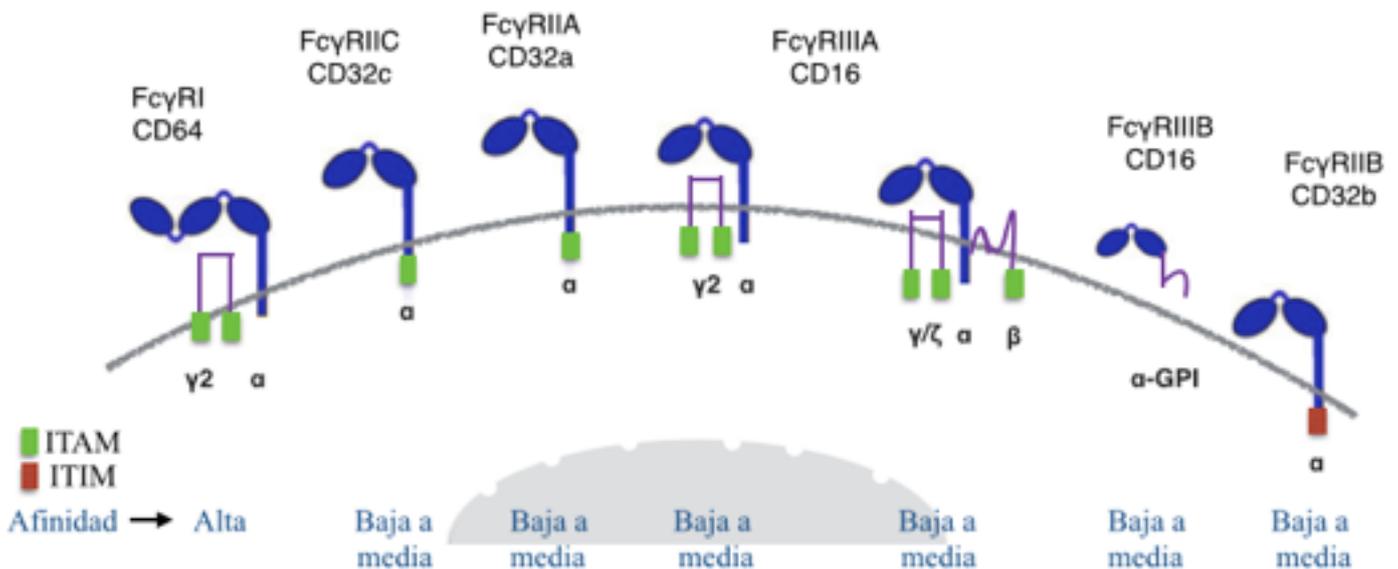


Figura 1.- **Familia de los receptores Fc gamma**

La familia de los receptores Fc gamma ($Fc\gamma R$) en humanos está conformada por 3 miembros $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RII$ y $Fc\gamma RIII$, de los cuáles $Fc\gamma RII$ tiene a su vez de 3 diferentes receptores ($Fc\gamma RIIA$, $Fc\gamma RIIB$ y $Fc\gamma RIIC$) y el receptor $Fc\gamma RIII$ tiene 2 receptores diferentes ($Fc\gamma RIIIA$ y $Fc\gamma RIIB$). Así mismo se pueden dividir estos receptores en 2 grupos: los activadores y los inhibidores de la respuesta inmune. Los activadores presentan en su porción citoplasmática una secuencia de aminoácidos llamados ITAM con excepción del receptor $Fc\gamma RIIB$ que se une a la membrana gracias a un enlace con glicosilfosfatidilinositol (GPI). El receptor $Fc\gamma RIIB$ es exclusivo de neutrófilos humanos y aunque puede iniciar una serie de respuestas en neutrófilos, su mecanismo de señalización no se conoce aún. Los receptores inhibidores incluyen sólo al $Fc\gamma RIIB$ que contiene en su porción citoplasmática una secuencia llamada ITIM.

1.1.- Expresión de los diferentes receptores Fc gamma en leucocitos

Los receptores Fc γ están bien conservados entre diferentes mamíferos, se encuentran en muchas células del sistema inmunológico incluyendo los granulocitos, (como neutrófilos y eosinófilos), los fagocitos (como neutrófilos y macrófagos), los linfocitos del sistema inmunológico innato (como las células NK) y los linfocitos del sistema inmunológico adaptativo (como las células B) (cuadro 1) (1, 4 y 12). Estos receptores se expresan en los diferentes tipos de células y su expresión no es exclusiva de un solo tipo celular. Sin embargo, el receptor Fc γ RIIB se expresa exclusivamente en neutrófilos y es un receptor exclusivo de los humanos (12). Los neutrófilos también expresan el receptor Fc γ RIIA que también es expresado en macrófagos, monocitos, eosinófilos, plaquetas y células dendríticas (cuadro 1).

Los monocitos y los macrófagos expresan todos los tipos de receptores Fc activadores Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII en humanos y Fc γ RI, Fc γ RIII y Fc γ RIV en ratones (4).

Se ha reportado que algunos linfocitos T pueden expresar Fc γ R, sin embargo el papel de estos receptores en la función o desarrollo de las células T permanece indefinido (13, 4).

| Receptor | Principal ligando de anticuerpo | Distribución celular |
|---------------------------|---------------------------------|---|
| Fc γ RI (CD64) | IgG1 e IgG3 >IgG4>IgG2 | Neutrófilos, Macrófagos, Eosinófilo, Células dendríticas |
| Fc γ RIIA (CD32) | IgG1>IgG2 e IgG3>IgG4 | Neutrófilos, Macrófagos, Eosinófilo, Mastocitos, Monocitos |
| Fc γ RIIB (CD32) | IgG1>IgG2 e IgG3>IgG4 | Neutrófilos, Macrófagos, Eosinófilo, Mastocitos, Células dendríticas, Células B |
| Fc γ RIIIA (CD16A) | IgG e IgG3 | Macrófagos, Mastocitos, Basófilos, Células NK, Células dendríticas |
| Fc γ RIIIB (CD16B) | IgG e IgG3 | Neutrófilos |

Cuadro 1.- Receptores Fc gamma y su distribución en los leucocitos

1.2.- Señalización de activación por parte de los receptores Fc gamma

La unión de las IgG con las FcγR resulta en la fosforilación de las porciones ITAM intracelulares del receptor Fc, lo cual desencadena la vía de señalización de la célula (12, 14). El mecanismo de activación no está completamente claro, pero en el panorama general las respuestas moleculares

iniciales se activan cinasas de la familia Src, las cuales son encargadas de fosforilar los residuos de tirosinas de las secuencias ITAM, seguido por la activación de otra cinasa de la familia Syk, ésta activa diversas moléculas de señalización tal como la fosfoinositol 3- cinasa (PI3K), fosfolipasa Cγ (PLCγ), las moléculas adaptadoras SLP76 (Proteínas de leucocitos con dominios SH2 de 76 kDa) y LAT (enlazador para activación de células T) (Figura 2). Estas moléculas se organizan y activan varias vías de señalización, dependiendo del tipo de célula particular activado por su receptor Fc gamma específico, dando lugar a respuestas celulares particulares y cambios transcripcionales (4, 15, 16). Por ejemplo FcγRIIIA activa la proteína tirosin cinasa específica de leucocitos (LCK) en células NK mientras que en monocitos y mastocitos activan proteínas tirosin cinasa Lyn y hek (15, 17).

La activación de PLCγ por su parte, conduce a la formación de Inositol trifosfato (IP3), Diacilglicerol (DAG) lo cual inicia la movilización de calcio intracelular (15) (figura 2). La importancia de la respuesta fisiológica dada por los FcγR se demuestra por el hecho de que la respuesta inmune mediada por los antígenos en forma de complejos inmunes es más fuerte que la respuesta inmune mediada por el antígeno solo (18).

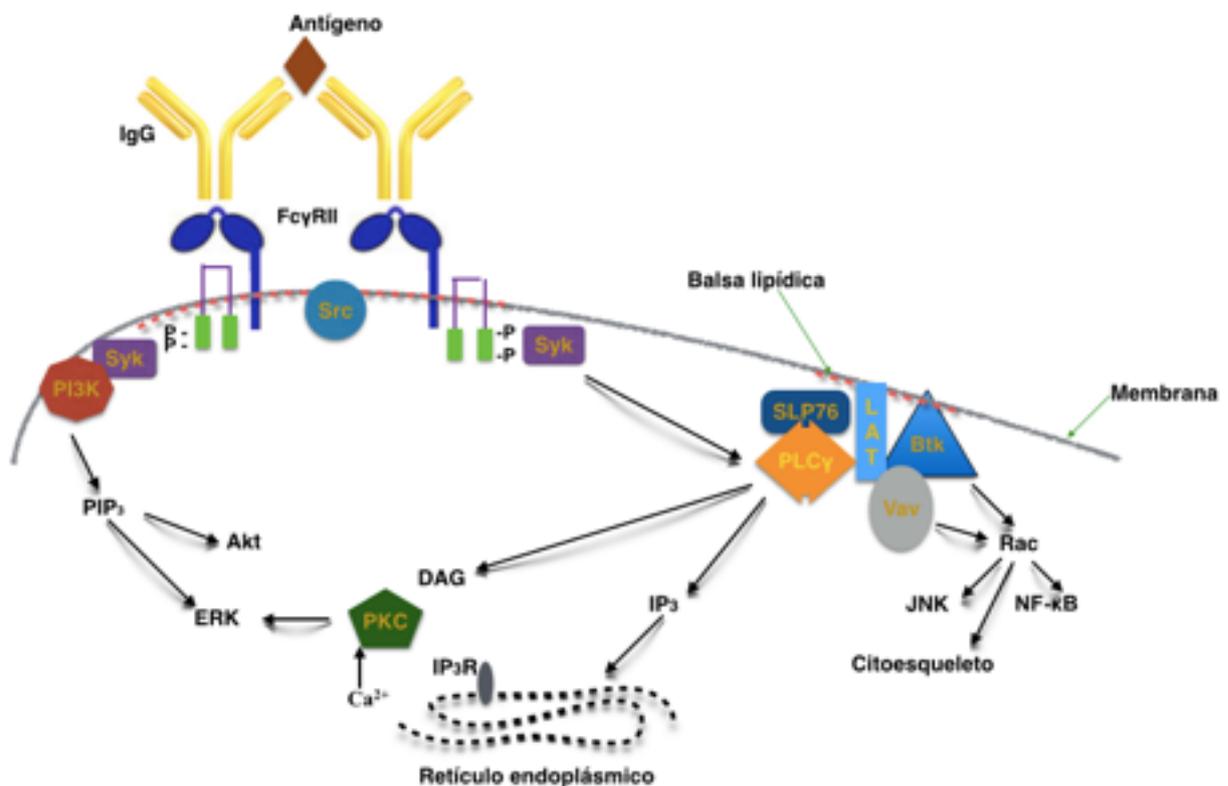


Figura 2.- Señalización de activación por parte de los receptores Fc gamma Para todos los Fc γ R el entrecruzamiento de estos por parte de su ligando IgG unido a su antígeno induce la activación de una cinasa de la familia Src, la cual a su vez fosforila la secuencia de aminoácidos llamados ITAM de los receptores Fc γ , esta secuencia ITAM una vez fosforilada es el sitio de unión de otra cinasa llamada Syk, que a su vez activa diferentes moléculas para desencadenar la vía de señalización y dar como resultado las diferentes respuestas inmunes como son la fagocitosis, estallido respiratorio, citotoxicidad dependiente de anticuerpos, degranulación y liberación de mediadores inflamatorios y producción de citocinas.

Existe sin embargo un receptor que en su porción citoplasmática no contiene residuos de tirosina llamados ITAM, por lo tanto no sigue la vía de señalización antes mencionada. El receptor Fc γ RIIB (CD16b) está anclado a la membrana celular por medio de un glucosilfosfatidilinositol (GPI) el cual es un glucolípido que forma parte de las balsas lipídicas, las cuales se sabe que pueden ser sitios de montaje para moléculas de señalización (19). No se conocen otras subunidades asociadas con el receptor Fc γ RIIB y los mecanismos de señalización de este receptor permanecen indefinidos, sin embargo se sabe que es un receptor de baja afinidad y que comprende dos dominios de inmunoglobulina en su región extracelular; así mismo presenta alotipos que define a un neutrófilo humano (HNA-1 Y NA) ya que este es un receptor que se expresa exclusivamente en neutrófilos y es exclusivo de los humanos (4, 20)

1.3.- Señalización de inhibición por parte de los receptores Fc gamma

Como ya se había mencionado antes, existe un solo receptor que modula negativamente la respuesta inmune; este receptor es el Fc γ RIIB el cual se une con baja afinidad a su ligando IgG. Aunque el receptor Fc γ RIIB fue descrito por primera vez en linfocitos B en donde regula las señales de activación del receptor de antígeno de células B (BCR) para inhibir la producción de anticuerpos por las células B (4), este Fc γ R es el más ampliamente expresado, estando presente en prácticamente todos los leucocitos con excepción de las células NK y células T (11,16).

Existen dos isoformas, Fc γ RIIB1 y Fc γ RIIB2 generados por “splicing” alternativo. El análisis molecular del Fc γ RIIB en la activación de células B estableció que ambas isoformas son igualmente capaces de inhibir la activación de la célula B inducida por anti inmunoglobulina. Sin embargo, hoy en día se sabe que Fc γ RIIB1 se expresa exclusivamente en células B y Fc γ RIIB2 está expresado en los otros tipos celulares en los cuales se expresa el receptor Fc γ RIIB (16, 21).

Entre los Fc γ R clásicos, el Fc γ RIIB es el único que posee una secuencia ITIM en su porción citoplasmática. Se ha demostrado en ratones que Fc γ RIIB juega un papel crucial en la prevención de reacciones autoinmunes, es por eso que los mecanismos moleculares de inmunosupresión por parte del Fc γ RIIB han sido estudiados (22). Se sabe que las señales de este receptor inhibitorio se inician por la acción de fosfatasas. La señal inicia cuando el BCR es entrecruzado con el Fc γ RIIB por parte de complejos inmunes de IgG que se encuentran opsonizando antígenos. Al entrecruzarse los residuos de tirosina ITIM de la porción citoplasmática del receptor Fc γ RIIB son fosforilados por una cinasa de la familia Src, Lyn y recluta SH2 que contiene inositol 5 fosfatasa (SHIP1), la cual a su vez hidroliza fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) y finalmente atenúa las señales de activación y supervivencia en células B (23-24).

Debido a que el receptor Fc γ RIIB regula de forma negativa la respuesta inmune, se ha propuesto que es un control para la tolerancia de inmunidad humoral. Esto es: se ha establecido que juega un

papel central para prevenir que las células B generen anticuerpos autorreactivos. Adicionalmente Fc γ RIIB regula la actividad de otros estimuladores de células B, incluyendo la IL-4, lipopolisacáridos (LPS) y el factor de activación de célula B (BAFF) que amplifican la proliferación y diferenciación impulsada por el BCR al suprimir la expresión de estas moléculas coestimuladoras (16, 25).

Así mismo la importancia del receptor inhibidor Fc γ RIIB en modular la actividad de las células B y la tolerancia humoral esta soportado por estudios en ratón. Se ha demostrado que la expresión de el receptor inhibidor es requerido para mantener la tolerancia a lo propio. Ratones C57BL/6 que son deficientes de este receptor desarrollan lupus ligado a la autoinmunidad que progresa a una fulminante glomerulonefritis y mortalidad prematura (26).

2.- Neutrófilos

Los neutrófilos, también denominados polimorfonucleares (PMN), son leucocitos de tipo granulocito y son componentes indispensables del sistema inmune innato para la defensa contra microorganismos patógenos ya que son rápidamente reclutados al sitio de la infección. Son generados en la médula ósea en gran número, por lo que los convierte en los leucocitos circulantes más abundantes, sin embargo solo están pocas horas en circulación ya que son células de vida corta, se cree que sobreviven poco menos de 24 horas en circulación (27-29).

Se producen alrededor de 10^{11} células por día en un adulto humano normal (dando un porcentaje del 40 al 60% de los leucocitos). El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es esencial para la producción de neutrófilos y satisfacer la demanda de neutrófilos en una infección (28).

Sin embargo la producción de neutrófilos está regulada en gran medida por la tasa de apoptosis de los neutrófilos en los tejidos, ya que al ser células en gran producción se tiene que mantener la homeóstasis, para lograr esto los neutrófilos al morir por apoptosis son eliminados por los macrófagos en el hígado, bazo y médula ósea. Así mismo cuando no se regula adecuadamente la abundancia de neutrófilos puede causar enfermedades de forma directa como la neutrofilia que es la acumulación de neutrófilos en los tejidos (30). Por otro lado, la citocina proinflamatoria IL-17A producida por las células T especializadas juega un papel importante en la regulación homeostática y el recuento de neutrófilos en el sangre (31).

Los gránulos de los neutrófilos están clasificados dentro de tres distintos subconjuntos basados en la presencia de proteínas de gránulos característicos: unos son azurófilos (gránulos primarios) por la presencia de mieloperoxidasa (MPO), otros son específicos (gránulos secundarios) por la presencia de lactoferrina y los gránulos gelatinasa (gránulos terciarios) por la presencia de gelatinasa (28).

Durante el proceso de inflamación de un tejido infectado se reclutan células y moléculas de la inmunidad innata las cuales salen de la sangre y entran al tejido donde se necesitan para destruir al agente patógeno de modo directo. Los neutrófilos son las principales células inflamatorias ya que son reclutados rápidamente al sitio de la infección donde ingieren los agentes y destruyen patógenos sin la ayuda de una respuesta inmune adaptativa. Para esto los neutrófilos tienen que cruzar la pared vascular y llegar al sitio de la infección. Los neutrófilos destruyen los agentes patógenos por diferentes mecanismos como la fagocitosis, el estallido respiratorio, la liberación de proteasas y péptidos antimicrobianos. Estas respuestas son posibles gracias a la activación de sus receptores que desencadenan la función celular apropiada (3, 32).

El papel de los neutrófilos también es el activar otras células de la respuesta inmune ya que también generan señales quimiotácticas que atraen a monocitos y a células dendríticas e influyen a la diferenciación de los macrófagos para entrar a un estado proinflamatorio.

Por ejemplo, producen factor de necrosis tumoral (TNF) que impulsa a células dendríticas y a los macrófagos a su activación para atacar a los agentes patógenos (32).

En la cicatrización de las heridas también tienen tres funciones importantes : el reconocimiento de los microbios, generación de señales que regulan la acumulación de más neutrófilos, y la instigación de un programa basado en macrófagos que cambia el estado de dañado del epitelio de pro-inflamatorio y no replicativo, a antiinflamatorio y replicativo (33).

2.1.- Receptores de membrana en Neutrófilos

La función principal de los neutrófilos es la defensa contra agentes patógenos, proporcionando la primera línea de defensa contra microorganismos invasores, es por eso que los neutrófilos expresan un gran número de receptores de superficie celular para el reconocimiento de agentes patógenos invasores. Algunos de estos receptores son capaces del reconocimiento innato de las estructuras microbianas, mientras que otros como los receptores Fc, están vinculados a la activación de la respuesta inmune adaptativa (34).

Los distintos tipos de receptores en los neutrófilos expresados en su superficie celular incluyen aquellos acoplados a proteínas tipo G con 7 dominios transmembranales, los cuales están caracterizados por activar fuertemente la migración quimiotáctica del neutrófilo por lo tanto sus antagonistas son denominados quimioatrayentes. También expresan en su superficie diferentes receptores Fc que están principalmente involucrados en el reconocimiento de patógenos opsonizados por inmunoglobulinas, pero también participan en procesos inflamatorios mediados por complejos inmunes. Otros receptores de membrana de los neutrófilos son las selectinas, integrinas y varios receptores de citocinas; estos receptores por lo general están involucrados en la comunicación intracelular y la regulación de varias funciones de los neutrófilos.

Finalmente los neutrófilos también expresan receptores que forman parte de la inmunidad innata como los receptores tipo Toll y lectinas tipo C, los cuales juegan un papel importante en el reconocimiento de patógenos de forma directa. Sin embargo se ha observado que la señalización a través de los receptores tipo Toll resulta en la producción de la IL-8 con lo cual provoca un aumento en la tasa de fagocitosis y disminución en la quimiotaxis (34-36).

2.2.- Receptores Fc gamma y su señalización en neutrófilos

La activación celular a través de receptores de membrana es también requerida para iniciación de varios mecanismos de defensa por parte de los neutrófilos. Los neutrófilos en humanos expresan únicamente dos tipos de receptores Fc γ , el receptor Fc γ RIIA y el receptor Fc γ RIIIB, cabe mencionar que el receptor Fc γ RIIIB se expresa exclusivamente en neutrófilos. En contraste, los neutrófilos estimulados con interferón - γ (IFN- γ) pueden expresar el receptor Fc γ RI el cuál contiene una cadena α asociada a un dímero de cadenas gamma, cada cadena gamma contiene residuos de tirosina llamados ITAM (1, 4, 34).

Los receptores FcγRIIA y FcγRIIIB representan una combinación que es una firma de los neutrófilos humanos, la expresión del receptor FcγRIIIB en la superficie celular es 10 veces mayor que la del FcγRIIA, sin embargo en condiciones de reposo, las afinidades de estos dos receptores para la porción Fc de las IgG son igualmente bajas.

Existen evidencias que indican que la participación de cada uno de estos receptores estimula diferentes vías de señalización. Sin embargo, es más que probable que en condiciones fisiopatológicas ambos receptores trabajan simultáneamente (37).

La activación de los neutrófilos por complejos inmunes requiere tanto del receptor FcγRIIA como del FcγRIIIB, pero se ha propuesto que el FcγRIIIB sobre las microvellosidades de los neutrófilos podría representar el contacto inicial con los complejos inmunes para su inmovilización (38). De cualquier modo cuando los receptores Fcγ son activados, se desencadena una vía de señalización que resulta en las respuestas celulares.

La vía de señalización en los neutrófilos es igual que en otros tipos de células, los receptores Fcγ de baja afinidad se cree que señalizan a través de las secuencias denominadas ITAM presentes en la porción citoplasmática. En el caso del receptor FcγRIIA el entrecruzamiento de estos receptores conduce a la fosforilación de los residuos de tirosina de la secuencia ITAM, la cual posteriormente recluta a las tirosin cinasa Syk para formar el complejo del receptor, al activarse Syk se fosforilan diversos sustratos de otras moléculas por lo tanto comienza la señalización corriente a bajo por ejemplo PI3-K, ERK y ZAP-70. Así mismo se ha observado que SLP-76 es necesaria para la movilización de calcio y producción de superóxido. Es decir la vía de señalización del receptor FcγRIIA sigue la ruta clásica mediada por la secuencia ITAM (figura 3) (35, 39).

En contraste la vía de señalización por parte del receptor FcγRIIIB es desconocida ya que no cuenta con una porción ITAM en su opción citoplasmática (figura 3).

Sin embargo, se ha observado que estos dos receptores cumplen papeles diferentes en los neutrófilos FcγRIIA induce principalmente fagocitosis mediada por IgG y FcγRIIIB señala principalmente al núcleo para la activación de factores nucleares. Se ha descrito que FcγRIIA induce fagocitosis más eficientemente y su actividad fagocítica fue bloqueada por inhibidores de la familia Src, Syk, PI3-K y ERK, aunque el receptor FcγRIIIB podría mediar fagocitosis pero de forma menos eficiente (40).

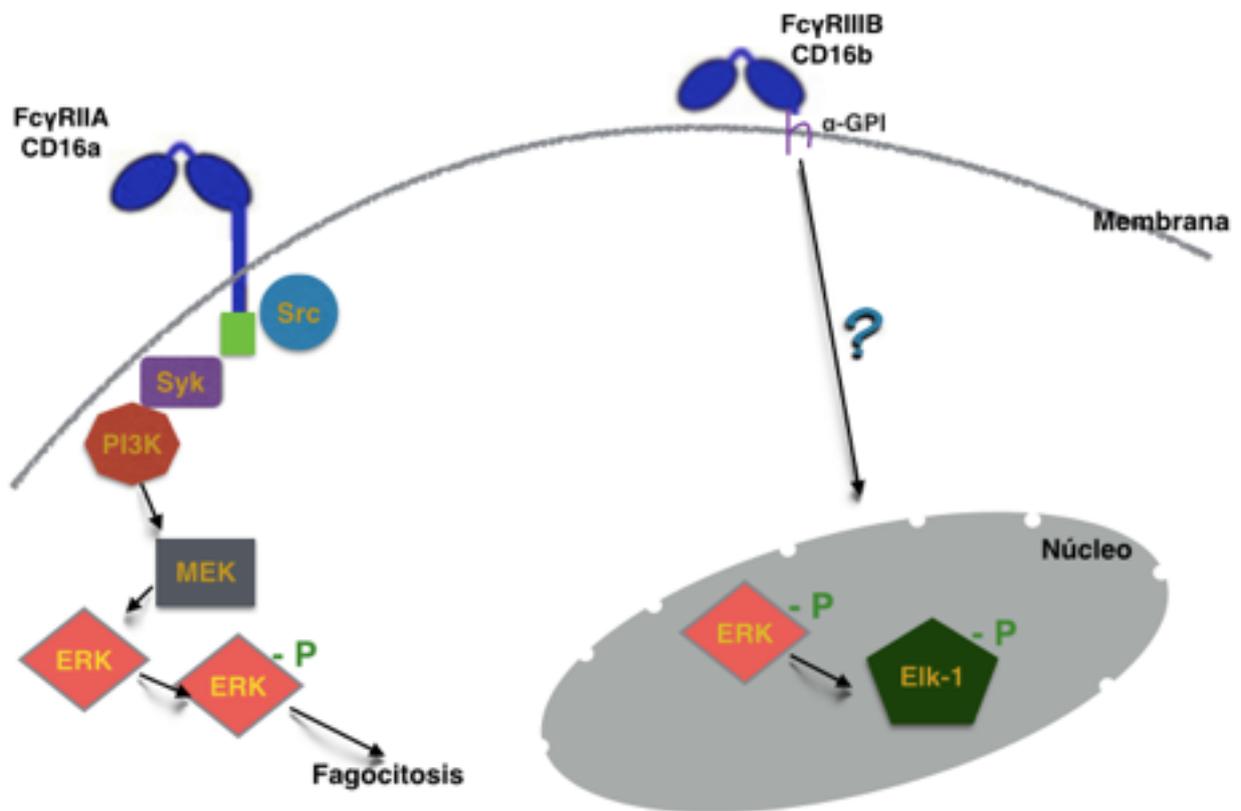


Figura 3.- **Receptores Fc gamma en neutrófilos y su señalización.**

En neutrófilos cada receptor cumple distintas funciones celulares por lo tanto inicia vías de señalización particulares. El receptor FcγRIIA sigue la ruta clásica mediada por la secuencia ITAM mientras que la vía de señalización del receptor FcγRIIIB sigue siendo un misterio, sin embargo se ha visto que incrementa ERK y Elk fosforilados en núcleo.

Estos receptores también son capaces de inducir movilización de Ca^{2+} intracelular, se ha observado que el receptor FcγRIIIB induce un aumento de Ca^{2+} que es independiente del receptor FcγRIIA. Además ambos receptores son sensibles al inhibidor de la proteína tirosin cinasa metil 2,5-dihidroxycinamato pero únicamente la señalización inducida por el FcγRIIA fue sensible al inhibidor de la proteína tirosin cinasa genisteína, el FcγRIIA pero no el FcγRIIIB se acopla a cAMP y la vía es dependiente de inositol 1, 4, 5- trifosfato que resulta en la movilización de Ca^{2+} (41, 42).

Por otro lado, en neutrófilos la producción de citocinas en respuesta a la activación celular es regulada a nivel transcripcional, así como la regulación de la apoptosis. Y se ha observado que el factor nuclear κB (NF κB) es requerido para el control transcripcional en la producción de citocinas y la apoptosis (43-44). Los receptores FcγRIIA y FcγRIIIB en neutrófilos son capaces de promover la activación de NF κB . Sin embargo, hay algunas diferencias entre ellos, ya que solo el receptor FcγRIIIB indujo la aparición de ERK y Elk fosforilado en núcleo (44). Estas son algunas evidencias que sugieren que tanto FcγRIIA como FcγRIIIB poseen diferentes capacidades de señalización. FcγRIIIB pero no FcγRIIA activa una vía de señalización única que conduce a la fosforilación restringida de ERK y Elk-1, independiente de Syk, PI3K o MEK. Pero esta vía no ha sido descrita hasta el momento (45).

3.- La vía de las MAPK

Todos los receptores de superficie celular cuya función es emitir señales son proteínas transmembranales o forman parte de complejos proteínicos que conectan el exterior con el interior de la célula. Las enzimas relacionadas con mayor frecuencia en la activación de receptores son las proteincinasas. Este grupo amplio de enzimas cataliza la fijación covalente de un grupo fosfato a una proteína en el proceso reversible conocido como fosforilación de proteínas. Las proteincinasas relacionadas con receptores por lo general son inactivas, pero cuando un ligando se une a la parte extracelular del receptor, se activan y transmiten la señal al fosforilar y activar otras moléculas emisoras de señales dentro de la célula. Las proteincinasas fosforilan proteínas en tres aminoácidos (tirosina, serina y treonina). Las tirosincinasas son específicas para residuos de tirosina, mientras que las cinasas de serina/treonina fosforilan residuos de serina y de treonina. (3, 46).

La vía de las MAPKs en células eucariotas regulan múltiples procesos entre los cuales se encuentran la regulación de la expresión génica, mitosis, metabolismo, movilidad, sobrevivencia, apoptosis, diferenciación e inflamación crónica (47). Esta vía es activada por estímulos extracelulares que incluyen hormonas, mitógenos, factores tróficos y de crecimiento, citocinas inflamatorias y diversas formas de estrés celular (osmótico, redox, radiación, etc.) (48).

En mamíferos existen por lo menos 13 miembros de la superfamilia de MAPK que se pueden dividir en 7 grupos basándose en la secuencia de similitud: las convencionales o típicas que son las protein cinasas reguladas por señal extracelular (ERK1 y ERK2); cinasas c-Jun N-terminal (JNK1, JNK2, JNK3); p38s (p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ); ERK5 (ERK5); ERK3s (ERK3, p97 MAPK, ERK 4) y ERK7s (ERK7, ERK8). Y las atípicas que no tienen conformaciones particulares, estas son ERK3/4, ERK7 y cinasa- nemo (NLK). Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares exactos involucrados en la activación de MAPKs atípicas, ya que no comparten muchas características de MAPKs convencionales. Cada grupo de las MAPKs puede ser estimulado por una cascada de protein cinasas separadas (48- 51).

Así mismo cada vía MAPK contiene tres niveles de cascadas que contiene una MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK, MAP3K, MEKK o MKKK), una MAP cinasa cinasa (MAPKK, MAP2K, MEK o MKK) y la MAPK. Estos tres niveles modulan respuestas a estímulos ultrasensibles. Las MAPKs pueden también inhibir la señalización por unión a sustratos catalíticamente inactivos (49).

La MAPK son activadas por fosforilación dual en las secuencias tripeptido Thr-X-Tyr, la secuencia de estos tripéptidos es diferente en cada grupo de MAPK: ERK (Thr-Glu-Tyr); p38 (Thr-Glu-Tyr) y JNK (Thr-Pro-Tyr). Las MAPKKK que son proteínas Ser/Thr cinasas a menudo se activan a través de la fosforilación y/o como resultado de su interacción con una pequeña unión a la GTP de las proteínas de la familia Ras/Rho en respuesta a estímulos extracelulares, además la transducción de señales a lo largo de la vía de las MAPK puede ser facilitada por proteínas andamio (48, 51, 52).

La vía clásica de las MAPK al ser activada por los receptores con actividad de tirosin cinasa cuya estimulación causa fosforilación en tirosina, genera lugares de interacción con diversas proteínas de señalización que contienen dominios de reconocimiento de fosfotirosina, entre ellas entran la fosfoinositol 3-cinasa (PI3K), la fosfolipasa C γ (PLC γ), algunas tirosin cinasas citosolicas y proteínas adaptadoras como Shc y Grb2. Por lo tanto la fosforilación de tirosinas genera lugares para interacción de proteínas que poseen secuencias de unión a fosfotirosina como los dominios SH2 llamados así por su presencia en la tirosin cinasa citosolica Src.

Esto permite a su vez la interacción de otra proteína adaptadora (Grb2) que además del dominio SH2 posee dos dominios SH3 que reconocen secuencias ricas en prolina como las presentes en la proteína Sos. La proteína Sos tiene un dominio con actividad Ras-GEF (factor de intercambio de nucleótidos de guanina) que cataliza el intercambio de GDP por GTP en la proteína G monomérica Ras, por lo tanto tras la estimulación del receptor Sos es reclutada por Grb2 a la proximidad de la membrana plasmática donde se encuentra Ras y la activa.

Se cree que la vía de señalización de las MAPK debe comenzar con la GTPasa monomérica Ras que se asocia con Raf, MEK y ERK (figura4) (52-54). El siguiente paso en la vía es la activación por Ras-GTP de Raf-1 perteneciente a la familia MAPKKK y cuando se activa Raf-1 se transloca a la membrana, lo cual provoca que se fosforilen algunos residuos de serinas por PKC o por una MAPKKK llamada PAK3, así como algunos residuos de treoninas por Src o JAK; de modo que estas cinasas también contribuyen a la activación.

Una vez en su forma activa Raf-1 fosforila especialmente a MEK1 y MEK2 posteriormente las MEK1 y 2 fosforilan a ERK 1 y 2; cabe mencionar que ERK1 y 2 fueron identificados por primer vez como estimulados por factores de crecimiento (Figura 4) (53). La activación de ERK por MEK incrementa actividades catalíticas de ERK 1y 2 y éstos tienen al menos 160 potenciales en el citosol y el núcleo, entre los cuales están los factores de transcripción, cinasas, fosfatasas, proteínas del citoesqueleto y proteínas relacionadas a la apoptosis (52, 54).

La señalización de las MAPK modulan componentes que pueden variar con el tiempo y la ubicación, sin embargo las MAPKs activa frecuentemente se traslocan del citoplasma al núcleo donde fosforilan sus moléculas blanco (figura 4) (49).

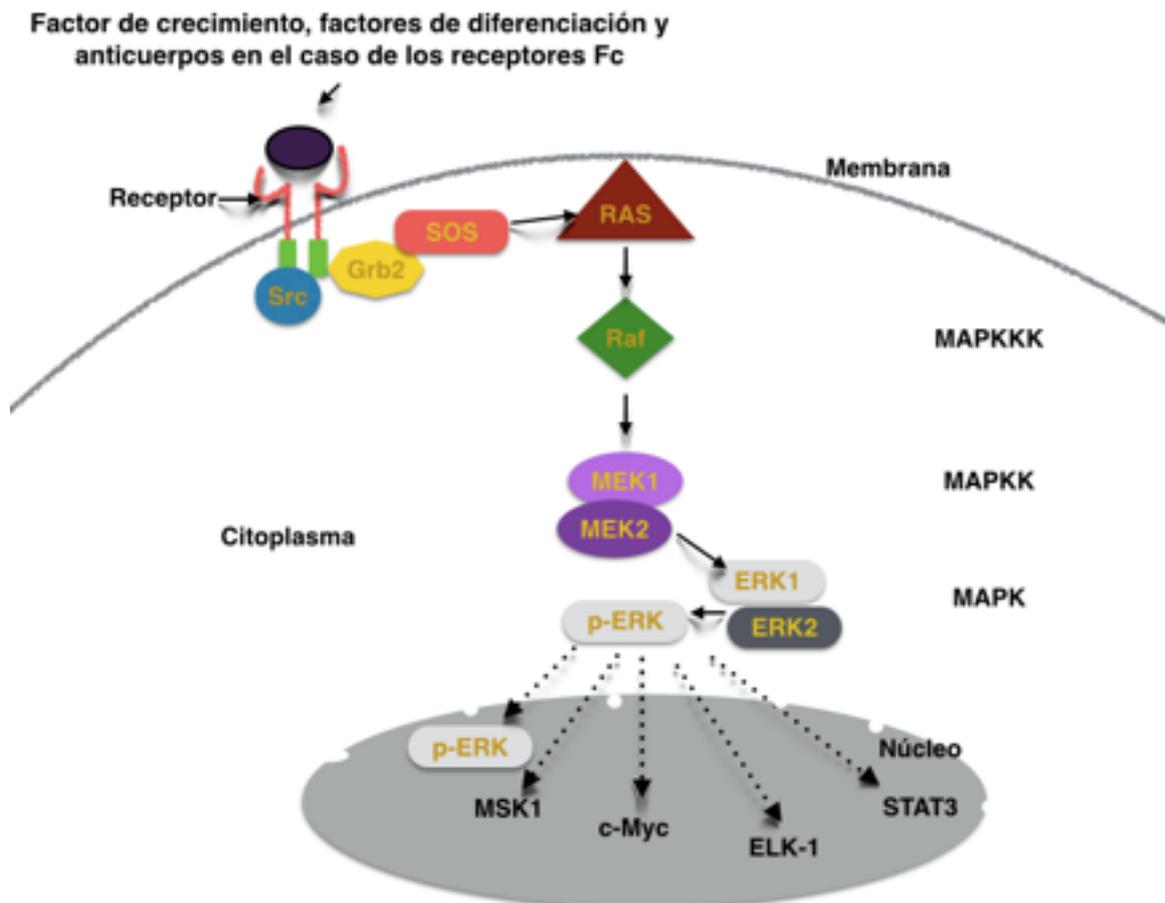


Figura 4.- La vía de la MAPK

La activación de las MAPK determina la inducción de varias respuestas celulares muy importantes como activación de factores de transcripción, regulaciones transcripcionales, remodelación de la cromatina nuclear, inducción genética inmediata, producción de citocinas, regulación de apoptosis y progresión del ciclo celular. Las GTPasas Ras y Rho en turno controlan la cascada independiente de la vía de las MAPK. Por ejemplo, mientras que Ras estimula la vía de señalización de Raf/MEK/ERK, Rac o Rho relacionados con la unión a proteínas GTP activan una distinta ruta bioquímica para la estimulación de JNK.

3.1.- MAPK en la respuesta inmune

Mientras que el reconocimiento de antígenos comienza a nivel del receptor, son los componentes de señalización intracelulares de cada receptor y la forma en la que interactúan entre sí que en última instancia determinan la respuesta transcripcional específica y la respuesta inmunológica. Entre las vías que se activan en la respuesta inmune, se activa la vía de las MAPK y tras la activación de las MAPKs se regulan eventos celulares clave en el citoplasma por fosforilación de proteínas asociadas a la membrana, en las cuales la fosforilación de las secuencias de treonina o tirosina en su parte citoplasmática es necesaria para la activación de las MAPK. Las MAPK activadas también se traslocan al núcleo para fosforilar factores de transcripción como son c-Jun, c-Fos, Elk-1 y c-Myc que coordinan la expresión de genes diana (55, 56).

Las MAPKs participan en la respuesta inflamatoria principalmente para la activación de la expresión génica. Un grupo de factores de transcripción específicos de secuencia conocidos como AP-1 son sustrato convencionales para JNK y p38. Además JNK y p38 pueden fosforilar una gran cantidad de proteínas intracelulares, incluyendo reguladores de transcripción que a su vez regulan varios procesos fisiológicos. Estudios han revelado nuevos mecanismos de señalización que son esenciales para propagar las respuestas de las MAPK dependiente del sistema inmune (55). Por ejemplo los receptores Fc γ R también participan en la activación de la vía de las MAPK, en neutrófilos está descrito que el Fc γ RIIIB pero no el Fc γ RIIA promueve un fuerte incremento de ERK y Elk-1 fosforilado en el núcleo, estos datos muestran que diferentes receptores Fc en neutrófilos poseen diferentes capacidades de señalización, esto es; Fc γ RIIIB y no el Fc γ RIIA activa la vía de señalización única que conduce a la fosforilación de ERK y Elk-1 en el núcleo independientemente de Syk, PI3K o MEK (figura 4) (45).

4.- NF- κ B

Los factores de transcripción son proteínas que regulan la respuesta y la larga vida celular, así mismo coordinan y regulan la expresión de un gen o de un grupo de genes. En muchos casos regulan su propia expresión y también es frecuente que regulen a otros factores de transcripción. Un factor de transcripción clave que sirve para responder a los cambios en el medio ambiente es el factor nuclear κ B (NF- κ B) (57, 58).

El NF- κ B es un factor de transcripción que puede inducir y reprimir la expresión de genes mediante la unión a secuencias de DNA discretas conocidas como elementos κ B en promotores y "enhancers". La activación de NF- κ B típica, implica la fosforilación de I κ B por la cinasa I κ B (IKK) que resulta en la degradación de I κ B, esto libera NF- κ B y permite que se transloque libremente al núcleo.

Los genes regulados por NF- κ B incluyen: los que controlan la muerte celular programada (apoptosis), la adhesión celular, proliferación, la respuesta inmune innata y adaptativa, la inflamación, la respuesta celular de estrés y remodelación del tejido. Sin embargo, la expresión de estos genes está estrechamente coordinada con la actividad de muchas otras vías de señalización y factores de transcripción (59, 60).

La familia de NF- κ B tiene varios miembros, entre los cuales se incluyen RELA (p65), NF κ B1 (p50, p105) c-REL, RELB y NF κ B2 (p52, p100). Estas proteínas estructuralmente tienen una región conservada de 300 residuos de aminoácidos que contienen la dimerización, localización nuclear y dominios de unión a DNA. Las proteínas c-REL, RELB y RELA también tienen un dominio homólogo carboxilo terminal de transactivación que activa fuertemente la transcripción desde la unión de NF κ B en los sitios de los genes blanco. Las otras proteínas REL, tales como los homodímeros p50, carecen del dominio de transactivación; sin embargo se unen a sitios consenso NF κ B en el DNA por lo tanto funcionan como represores transcripcionales (69, 61).

Tanto p50 como p52 son sintetizados como proteínas precursoras y pueden funcionar como factores de transcripción nuclear, así mismo ambos homodímeros de p50 y p65 pueden interactuar con otros miembros de la familia I κ B. p105 y p100 contienen dominios repetidos de anquirina en su carboxilo terminal, similares a los encontrados en proteínas I κ B que funcionan como proteínas de unión a I κ B y retienen su subunidad NF- κ B dimérica en el citoplasma, inhibiendo su actividad (59).

Existen varias vías de activación de NF- κ B, pero la más frecuentemente observada es la canónica o vía clásica. Es inducida en respuesta a diversos estímulos inflamatorios, incluyendo el factor de necrosis tumoral - α (TNF α), citocinas proinflamatorias, interleucina 1 (IL-1), el acoplamiento del receptor de células T (TCR), los receptores Fc y la exposición a productos bacterianos tales como lipopolisacáridos (LPS) (7, 62).

4.1.- La vía de NF- κ B en la respuesta inmune

La familia de NF- κ B juega un papel clave en el control de la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. Las proteínas NF- κ B están presentes en el citoplasma asociadas a proteínas inhibitoras que son conocidos como inhibidores de NF- κ B (I κ Bs), existen tres tipos de I κ Bs (I κ B α , I κ B β y I κ B γ) éstas proteínas contienen de 6 a 7 repeticiones de anquirina. Después de la activación por un gran número de inductores, las proteínas I κ B son fosforiladas, ubiquitinadas y degradadas por el proteosoma, la degradación de los I κ B permite que las proteínas NF- κ B se trasladen al núcleo y se unan al DNA para regular la transcripción de un gran número de genes, incluyendo péptidos antimicrobianos, citocinas, proteínas de respuesta a estrés y proteínas anti apoptóticas. La activación constitutiva de la vía de NF- κ B está asociada con enfermedades inflamatorias (61,63).

Los inductores más comunes y potentes en la activación de NF- κ B son citocinas proinflamatorias tales como TNF, IL-1, una variedad de moléculas características de bacterias, hongos y virus conocidos colectivamente como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o patrones molecular asociados a daños (DAMPs) y los receptores tipo Toll (63, 64).

Todos estos receptores resultan en la activación de los complejos I κ B kinasas (IKK) los cuáles son activadores y moduladores de la actividad de NF- κ B. Los complejos IKK constan de dos subunidades catalíticas IKK α y IKK β y una subunidad reguladora nombrada IKK γ o NEMO. La vía clásica de es dependiente de IKK β y es la responsable en cuanto a la activación de los

heterodímeros de NF- κ B los cuales consisten en NF- κ B1 (p50), RELA (p65) y las subunidades c-REL (62).

Se ha establecido que la ruta clásica de NF- κ B basada en la degradación de I κ B dependiente de IKKB, es esencial para la inmunidad innata. La activación y la translocación al núcleo de los dímeros de NF- κ B (en su mayoría p50 y RELA) están asociados con el incremento en la transcripción de genes que codifican para moléculas importantes en la respuesta inmune, las cuales son requeridas para la migración celular, el proceso inflamatorio y la fagocitosis, tales como quimiocinas, citocinas moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1 y ELAM), enzimas que producen mediadores inflamatorios secundarios e inhibidores de apoptosis (63).

La vía de NF- κ B se puede activar por distintos estímulos y receptores de membrana entre ellos por citocinas como TNF e IL-1, estas citocinas son producidas por macrófagos y monocitos y participan en la activación de linfocitos y activación de leucocitos. TNF se encuentra presente en la superficie celular y cuando es activado recluta a la proteína adaptadora TRADD, quien a su vez interactúa con el extremo carboxilo de TRAF2 la cual tiene afinidad por diversas proteínas de señalización corriente abajo como ERK, MEKK3, RIP que son proteínas con un papel clave en la activación de IKK (figura 5).

Sea cual sea el estímulo en las células en reposo, NF- κ B se encuentra en el citoplasma en estado inactivo unido a sus I κ B. La activación de NF- κ B empieza por la degradación de sus I κ B al fosforilar aminoácidos de serina específicos de los I κ B por las IKK, lo cual conduce a la ubiquitinación de I κ B con lo cual el proteosoma degrada los I κ B; una vez que el NF- κ B es liberado por la degradación de sus I κ B ya es capaz de trasladarse al núcleo donde se une a secuencias de DNA específicas de genes diana y estimula su transcripción (Figura 5) (62,63,65).

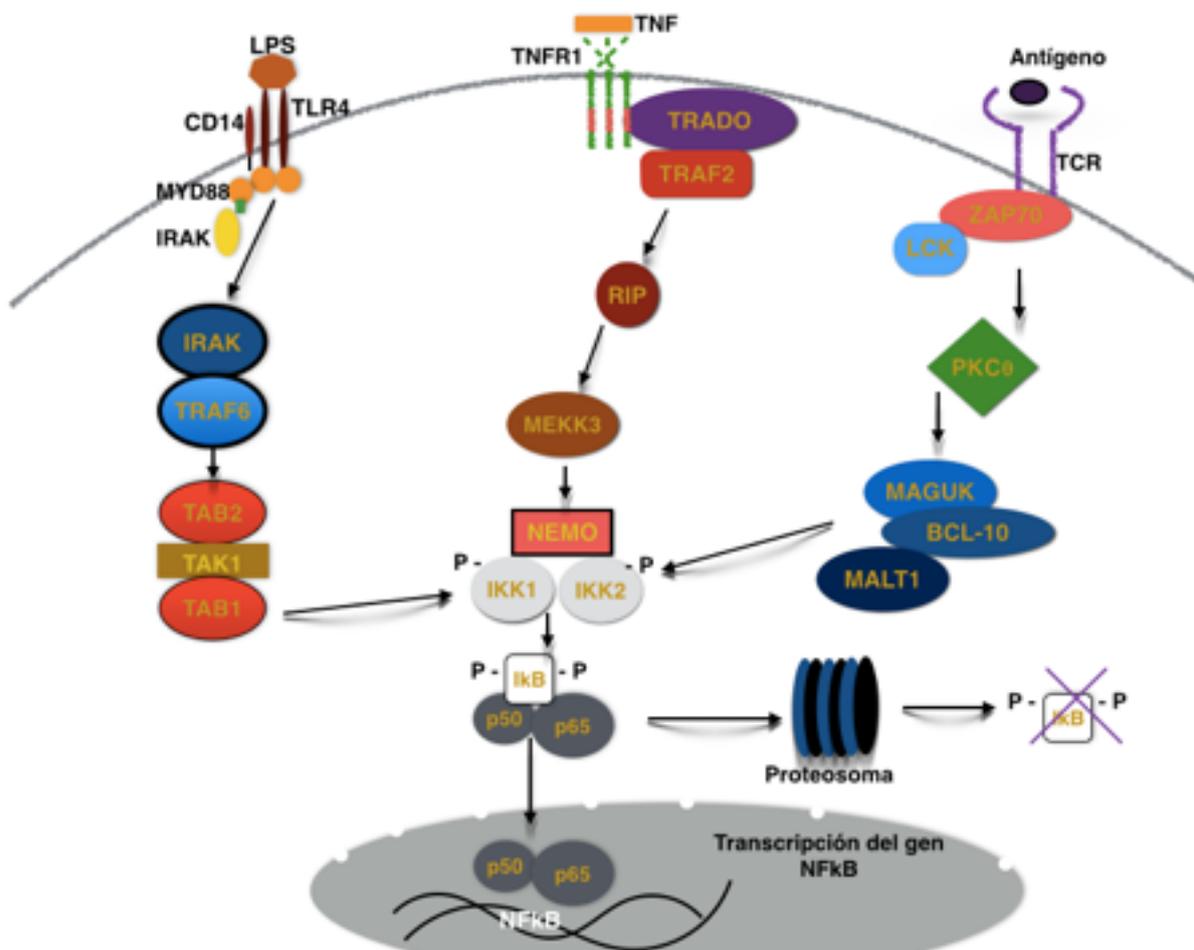


Figura 5.- vía de activación de NF- κ B

La activación de NF- κ B puede ser estimulada por muchas vías incluyendo lipopolisacáridos (LPS) factor de necrosis tumoral (TNF) y el receptor de células T (TCR). NF- κ B se encuentra en el citoplasma en estado inactivo unido a sus I κ B, la activación de NF- κ B empieza por la degradación de sus inhibidores (I κ B) por las I κ B cinasas (IKK) lo cual permite la ubiquitinación de I κ B, por lo que el proteosoma degrada los I κ B; una vez que el NF- κ B es liberado por la degradación de sus I κ B ya es capaz de trasladarse al núcleo, donde se une a secuencias de DNA específicas de genes diana y estimula su transcripción.

5.- Movilización de Ca²⁺ intracelular

Los procesos de señalización celular regulados por calcio (Ca²⁺) implican cambios en la concentración del Ca²⁺ en el citoplasma y otros compartimientos celulares. El Ca²⁺ libre en el citosol es un mensajero celular, por lo tanto es un componente crítico en la señalización de las células normales. Es por esto que una multitud de procesos celulares son controlados a través del incremento de Ca²⁺ en el citosol y a su vez una multitud de señales celulares externas inducen o regulan la señalización de Ca²⁺ (66, 57).

Por lo tanto el Ca²⁺ es importante para la señalización y funciones celulares. El Ca²⁺ puede regular la contracción muscular, la neurotransmisión, la secreción de hormonas, mitosis, la expresión genética, proliferación celular y diferenciación celular (68).

La regulación de la concentración de Ca²⁺ extracelular es constante, la concentración fisiológica es de 1.0 mM. Cuando la señalización del Ca²⁺ es estimulada en una célula, el Ca²⁺ entra al citoplasma de una de dos fuentes generales: se libera de los almacenes intracelulares o entra a la célula a través de la membrana plasmática, ambos procesos se producen simultáneamente o bien secuencialmente. En muchas células excitables, la entrada de Ca²⁺ puede ser activada por la despolarización de la membrana; la entrada de Ca²⁺ desencadena la movilización adicional de Ca²⁺ intracelular a través de la activación de rianodina, en un proceso conocido como Ca²⁺ inducido por la liberación de Ca²⁺, sin embargo la principal fuente de Ca²⁺ para las células es a través de canales altamente selectivos de calcio dependientes de voltaje. (67, 69).

Sin embargo existen otras formas de movilizar Ca²⁺ intracelular, tal como los receptores de membrana; entre los cuales están los Fc γ R y el TCR. En estas células no excitables un paso inicial muy importante es la liberación de Ca²⁺ intracelular desde los almacenes internos de unión a un segundo mensajero y a su receptor en el retículo endoplásmico (RE). Comúnmente el mensajero es inositol 1,4,5-trifosfato. Por tanto el Ca²⁺ es un segundo mensajero que puede difundirse en toda la célula, lo que permite que la señal active diversas proteínas diana. También son un medio para amplificar la señal inicial, dado que una molécula de enzima activada puede producir cientos de moléculas de segundos mensajeros (3, 67).

Las células no excitables o independientes de voltaje, son generalmente activadas por cascadas de señalización y en cuanto a la liberación de Ca²⁺, la vía más común involucra la activación de fosfolipasa C (PLC), generación de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) a partir de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) (figura 6).

En el caso de la señalización por parte de receptores de células T (TCR), los receptores de las células B (BCR) o incluso los Fc γ R, la PLC γ es también activada por el estímulo de antígenos en donde se activan residuos de tirosina en la parte citoplasmática del receptor por parte de una cinasa como Src (70, 4).

La vía de señalización común que conduce a la movilización de Ca^{2+} intracelular empieza con la activación de un receptor. En el proceso de entrecruzamiento de tales receptores se produce un reclutamiento y una activación de un grupo de proteínas unidas a otras proteínas adaptadoras que llevan a la fosforilación y activación de la $\text{PLC}\gamma$, la cual se recluta hacia la membrana celular por la forma fosforilada de LAT. En este lugar la $\text{PLC}\gamma$ es fosforilada por ZAP-70 y otras cinasas, posteriormente la $\text{PLC}\gamma$ activada cataliza la hidrólisis de un fosfolípido de membrana llamado fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PIP_2) a dos segundos mensajeros: IP_3 y DAG. El IP_3 se desplaza y se une a su receptor, ubicado en la membrana del retículo endoplásmico causando la salida de Ca^{2+} almacenado en su interior, la liberación de Ca^{2+} provoca un gran aumento en la concentración de Ca^{2+} libre intracelular (Figura 6) desde una cifra basal cercana a 100nM hasta una cifra máxima de $600 - 1000\text{ nM}$ lo cual provoca la activación de otras señales intracelulares (9, 71, 72).

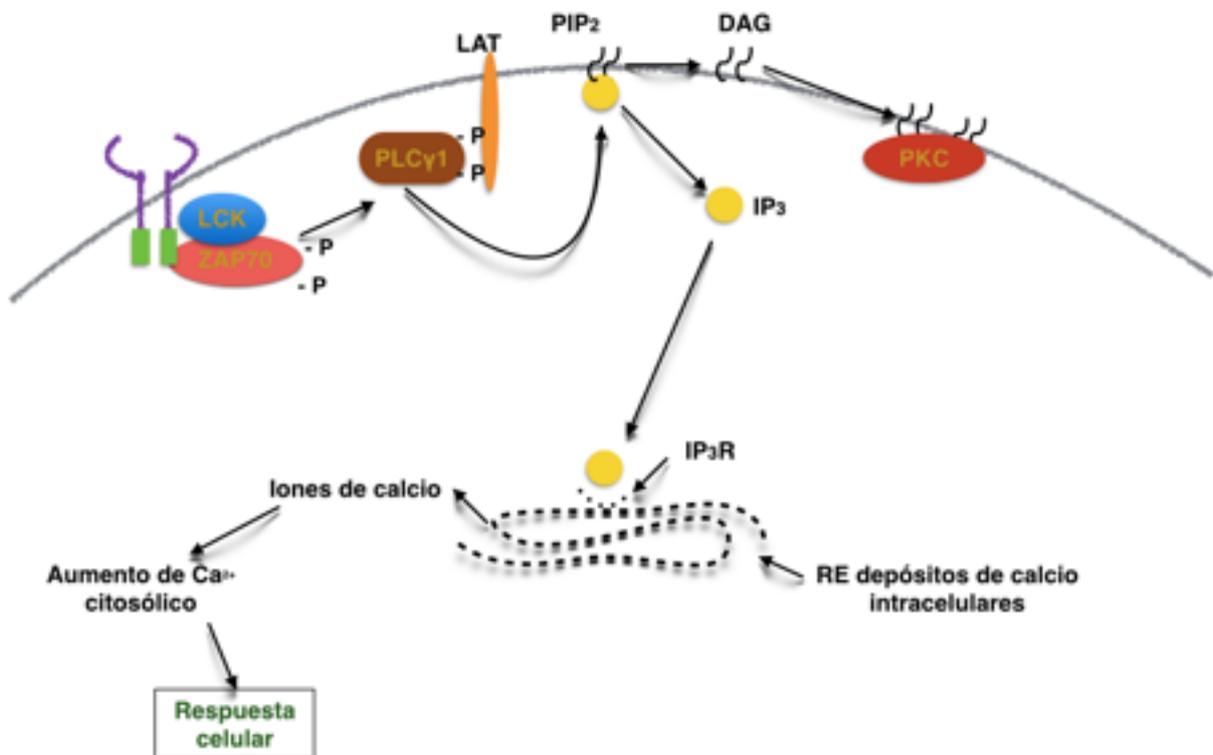


Figura 6.- Vía de señalización intracelular del Ca^{2+}

La vía común para inducir movilización de Ca^{2+} intracitoplásmico es la que se observa en los receptores BCR, TCR ó $\text{Fc}\gamma\text{R}$ en donde la señal comienza con la activación del receptor, lo cual lleva a la activación de $\text{PLC}\gamma$. Esta última, hidroliza el PIP_2 en IP_3 y DAG. El IP_3 abre los receptores IP_3R ubicados en el retículo endoplásmico y permite la salida de Ca^{2+} desde los depósitos del retículo y esto permite continuar diferentes vías de señalización para una respuesta celular específica.

Una vez que se logra incrementar el nivel del Ca^{2+} intracelular, se activan otras vías de señalización y factores de transcripción que finalmente se unen al ADN y dan lugar a la producción de todas las proteínas, citocinas, etc., relacionadas con la cascada inflamatoria.

Dentro de estas vías tenemos: La vía de la calmodulina - calcineurina, con activación final del factor nuclear de células T activadas, la vía de la cinasa dependiente de Ca^{2+} - calmodulina (CaMK), que tiene como factores de transcripción la proteína unida al elemento de respuesta al monofosfato de adenosina cíclico (CREB) y el factor aumentador del miocito 2, la vía del factor nuclear κB (NF- κB) (72).

Como se había mencionado anteriormente, los Fc γ R también son capaces de inducir movilización de Ca^{2+} intracelular. En neutrófilos, se ha visto que tanto el receptor Fc γ RIIA como el Fc γ RIIB inducen movilización de Ca^{2+} de una forma diferente. El Fc γ RIIB induce un aumento de Ca^{2+} después del entrecruzamiento independiente del receptor Fc γ RIIA, se ha observado que Fc γ RIIB a diferencia del Fc γ RIIA induce cambios en la concentración de Ca^{2+} dependiente de eventos de fosforilación de tirocinas, además es resistente a el inhibidor de la proteína tirosin cinasa, resistente a la elevación de la concentración en cAMP y es independiente en los cambios de la concentración de IP3, lo cual sugiere que estos receptores promueven la movilización de Ca^{2+} intracelular por vías distintas (11).

Planteamiento del problema

Debido a que los receptores Fc gamma expresados en la membrana celular de los leucocitos contribuyen a las funciones de protección del sistema inmunológico cuando reconocen a los anticuerpos que se encuentran unidos a células infectadas o a antígenos ayudando a desencadenar una respuesta celular para eliminarlo, es importante estudiarlos de forma individual para poder evaluar cuáles son las vías de señalización que desempeñan cada uno en la respuesta inmune. Es por esto que resulta de nuestro interés obtener líneas celulares que expresen los receptores **FcγRIIA, FcγRIIB o FcγRIIB**.

Así mismo, sabiendo que el receptor FcγRIIB es exclusivo de neutrófilos y que hasta el momento se ha podido expresar artificialmente en otras líneas celulares como HL-60 y K-542 pero no se ha podido comprobar su funcionalidad en estas células. Es de interés para este trabajo comprobar la funcionalidad de este receptor expresado en otros tipos celulares. Debido a que los neutrófilos son células de vida corta y por tanto no se pueden mantener en cultivo por lo que complica los ensayos en tiempos largos, además cada que se requiere hacer ensayos con estas células es necesario purificarlos de la sangre de donadores y así estudiar el receptor FcγRIIB.

Por otra parte, la obtención de células NIH3T3 de origen murino que expresen los receptores FcγRIIA o FcγRIIB serán de utilidad para la producción de un anticuerpo monoclonal anti-FcγRIIB y así poder reconocerlo específicamente discriminado el FcγRIIA.

Hipótesis

Al expresar artificialmente el receptor FcγRIIB en células THP-1 podrá ser evaluado para demostrar su funcionalidad en dicha célula, con lo cual se podrán hacer ensayos con los que se resuelva la vía de señalización del receptor al ser activado. De igual forma, al obtener fibroblastos de ratón que expresen el receptor FcγRIIA o FcγRIIB de humano se podrá elaborar un anticuerpo monoclonal anti-FcγRIIB en un futuro proyecto.

Objetivos

General

Expresión artificial del receptor FcγRIIIB en monocitos (THP-1), demostrando la funcionalidad del receptor en esta línea celular. Así como la obtención de fibroblastos de origen murino que expresen los receptores FcγRIIA ó FcγRIIB de humano.

Particulares:

Probar la funcionalidad del receptor FcγRIIIB en la línea celular THP-1 por movilización de Ca²⁺ intracelular.

Probar la funcionalidad del receptor FcγRIIIB en la línea celular THP-1 por activación de la vía de las MAPKs.

Probar la funcionalidad del receptor FcγRIIIB en la línea celular THP-1 por activación de NF-κB.

Demostrar la expresión del receptor FcγRIIA o FcγRIIB en los fibroblastos de ratón (NIH3T3).

Material y métodos

Células

Las líneas celulares utilizadas fueron NIH3T3 (fibroblastos de ratón) y THP-1 (monocitos de humano) ambas se cultivaron en cajas de cultivo de 25 cm² con medio RPMI (GIBCO cat. 31800-014), 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos.

Obtención de los plásmidos con el inserto FcγRIIA, FcγRIIB o FcγRIIB

A partir de los plásmidos con las secuencias para el FcγRIIA y el FcγRIIB, los cDNA fueron subclonados en el plásmido pcDNA 3. Sin embargo para obtener cantidades considerables de los plásmidos, ambos se amplificaron en bacterias *E.coli* de la cepa DH5α y posteriormente se purificaron por Maxiprep.

En cuanto al FcγRIIB se construyó un plásmido utilizando dos plásmidos comerciales de ORIGENE: el pCMV6-Neo (cat. SC128159) y el pCMV6-XL5 (Cat. 458168).

pCMV6-XL5 contiene el inserto que codifica para el receptor FcγRIIB sin embargo no cuenta con un gen de resistencia a un antibiótico para poder seleccionar las células en cultivo.

El plásmido pCMV6-Neo contiene un gen de resistencia a geneticina (G418). Mediante enzimas de restricción se separó el inserto FcγRIIB del vector pCMV6-XL5 y se subclonó en el plásmido pCMV6-Neo para obtener un solo plásmido con el gen que codifica para el receptor FcγRIIB y además un gen de resistencia al antibiótico G418 para poder seleccionar las células positivas en cultivo.

El pCMV6-XL5 contenía el inserto cDNA FcγRIIB clonado entre los sitios Eco R1 y Sal 1, además presenta dos sitios Not 1, uno antes de Eco R1 y otro después del sitio Sal 1 por lo que el cDNA de FcγRIIB pudo ser removido del vector usando la enzima Not 1. pCMV6-Neo también pudo ser cortado con la enzima Not-1 y una vez abierto, en estos sitios reconoció al inserto FcγRIIB.

Para lograr lo anterior primero se amplificaron los plásmidos pCMV6-Neo y pCMV6-XL5 y posteriormente se purificaron por Miniprep. Teniendo los plásmidos purificados se procedió a hacer las digestiones con las enzimas de restricción:

Se realizó la digestión del vector pCMV6-XL5 con la enzima Not-1.

Para hacer las digestiones de los plasmados en este trabajo, se realizaron de la siguiente forma: En un tubo eppendorf se mezcló 5 µl de agua, 3 µl del DNA de interés, 1 µl del buffer de la enzima y 1 µl de la enzima de interés. La mezcla se incubó a 37 °C durante 1 hora.

Para separar el inserto del resto del plásmido, esta digestión se corrió en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% y se cortó el fragmento del gel donde quedó el inserto y se guardó en un tubo eppendorf de 1.5 ml para posteriormente separar el inserto del gel con QIAEX II Gel extraction kit.

Una vez separado el fragmento del gel se corrió en un gel de agarosa al 1% para verificar que realmente teníamos el inserto puro. Con el inserto separado del resto del vector se realizó la ligación del inserto en el plásmido pCMV6-Neo. Para esto primero se hizo la digestión del plásmido pCMV6-Neo con la enzima Not-1 y se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% para verificar que se había cortado. Finalmente se obtuvo el plásmido pCMV6-Neo con el inserto ligado.

Con este nuevo plásmido se procedió a transformar bacterias para amplificarlo, con lo que se obtuvieron distintas colonias de bacterias, sin embargo no todas las colonias tenían el inserto colocado en la posición correcta para lo que se hizo un análisis de restricción, se eligieron las enzimas adecuadas que corten disparejamente el plasmado y el inserto para que al correr en un gel el DNA se obtengan bandas de diferente tamaño para poder determinar qué plásmido tiene el inserto ligado en la posición correcta.

Haciendo el análisis enzimático se determinó que la enzima a utilizar sería la Pst-1 ya que corta una vez el plásmido en la posición 3904 pb y dos veces el inserto, una en la posición 1107 pb y otra en 1714 pb. Por lo que el plásmido que tenga la posición correcta al hacer la digestión con esta enzima se obtendrá 3 bandas en (4641 pb, 2190 pb y 607 pb) contrariamente al plásmido con la posición incorrecta que se obtendrán 3 bandas en (5667 pb, 1467 pb y 607 pb).

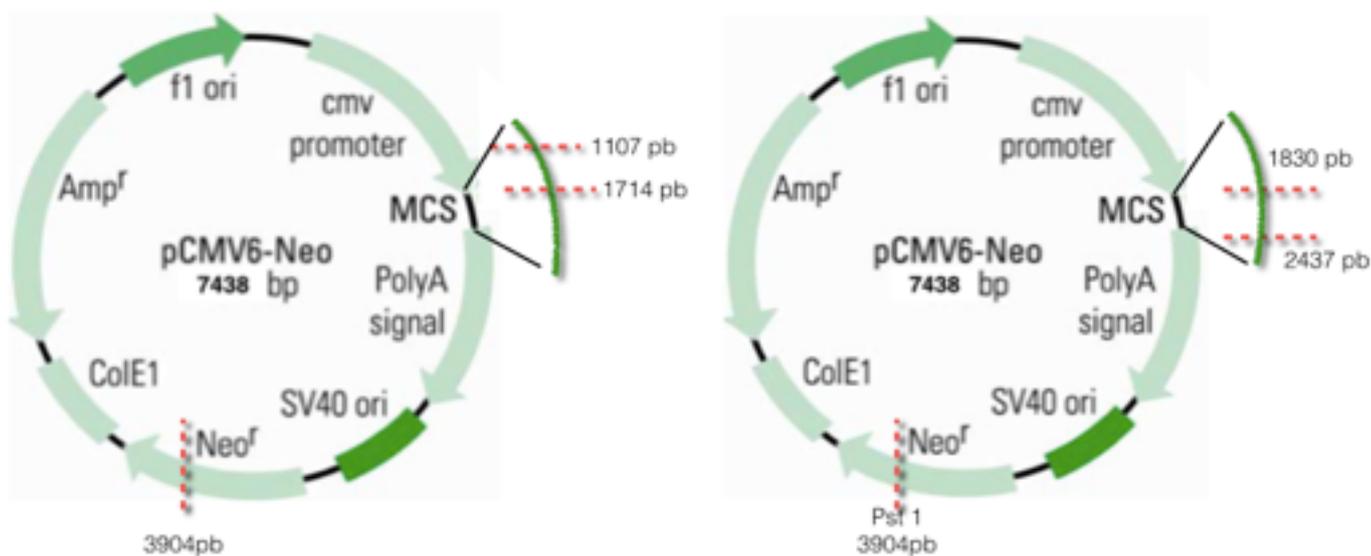


Figura 7.- Mapa del plásmido pCMV6-Neo

Al hacer la digestión de este plásmido con la enzima Pst-1 se obtendrán 3 fragmentos, los cuales dependiendo su tamaño molecular indicaran si el inserto del cDNA FcγRIIB se ligó de forma correcta o de forma errónea.

Teniendo estos datos se tomaron diferentes colonias de bacterias y se realizó miniprep para purificar el plásmido, posteriormente se hizo la digestión de estos plásmidos y se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 1% para determinar qué colonia tiene el inserto ligado en la posición correcta.

Teniendo ubicada la colonia con el inserto ligado en la posición correcta en el plásmido pCMV6-Neo se realizó un cultivo saturado de esta colonia y posteriormente se purificó con Maxiprep.

Transformación de bacterias

Para amplificar todos los plásmidos utilizados en este trabajo se utilizaron bacterias *E.coli* de la cepa DH5α y se utilizó el siguiente protocolo: se adicionó en un tubo eppendorf de 1.5 ml entre 20 y 50 μl de bacterias competentes de un medio turbio y 5 μl de ligación (10-15 ng DNA) (plásmido con el DNA de interés), se incubó en hielo durante 30 minutos, posteriormente se dió un choque térmico a 42°C por 60 segundos y se colocó en hielo durante 2 minutos. A esto se adicionó 0.4 ml de medio LB y se incubó a 37°C por 60 minutos.

Para sembrar las bacterias transformadas en placas de agar se colocó antibiótico a las placas de agar (100µg/ml ampicilina) y se esparció por toda la placa. Se tomaron 100 µl de plásmido con bacterias, se esparció por la placa de agar y se dejó a 37 °C la placa durante 24 horas para dejar crecer las bacterias ya transformadas.

Una vez formadas las colonias de bacterias se cultivaron en 5 ml de medio LB para su amplificación pertinente.

Miniprep

Se purificaron los plásmidos con el kit PROMEGA Plasmid Miniprep System bajo el siguiente protocolo: Se colocó 600 µl de cultivo saturado de bacterias en medio LB en un tubo eppendorf de 1.5 ml, a éste se le adicionó 100 µl de buffer de lisis celular y se mezcló por inversión y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 350 µl de la solución de neutralización fría (4-8 °C) y se mezcló por inversión. Después las muestras se centrifugaron a 14000 rpm en una microcentrífuga durante 3 minutos y el sobrenadante se transfirió a la columna del kit (pureyield minicolumn) y se colocó también el tubo colector para centrifugar a 14000 rpm en la microcentrífuga durante 1 minuto, después 400 µl del buffer de lavado se adicionaron a la minicolumna y se centrifugó a 14000rpm en la microcentrífuga durante 1 minuto. Después se colocó la minicolumna en un tubo eppendorf limpio de 1.5 ml y se agregó 30 µl del buffer de elución y se dejó reposar durante 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó la columna a 14000 rpm durante 1 minuto y se guardó el DNA a - 20 °C.

Maxiprep

Se purificaron los plásmidos con el QIAfilter Plasmid Maxi kits utilizando el siguiente protocolo: Se tenían 5 ml de un cultivo saturado de bacterias con los plásmidos correspondientes y con esto se hizo 500 ml de cultivo saturado con medio LB para obtener suficiente DNA.

Una vez teniendo 500 ml del cultivo saturado, éste se centrifugó a 6500 rpm en una ultracentrífuga con el rotor JA-14 durante 10 minutos y se obtuvo la pastilla de las bacterias a la cual se le agregó 10 ml de buffer P1 del kit y se resuspendió la pastilla, posteriormente se adicionaron 10 ml de buffer P2 y se mezcló por inversión para incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo se colocó la tapa al cartucho QIAfilter y se puso en un tubo convencional de 50 ml, transcurridos los 5 minutos se agregaron 10 ml de buffer P3 para lisar, el lisado se colocó en el cartucho QIAfilter y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo se equilibró el QIAGEN-tip agregando 10 ml de buffer QBT y se dejó a que bajara por la columna por simple gravedad. Transcurridos los 10 minutos se removió la tapa del cartucho QIAfilter y se colocó la punta dentro de la columna QIAGEN-tip y se filtró el lisado celular dentro del QIAGEN-tip y se dejó que cayera a la resina por gravedad, posteriormente se lavó el QIAGEN-tip con buffer QC, terminando los lavados se eluyó el DNA con 15 ml de buffer QF en un tubo de centrifuga para el rotor JA-20 en este mismo tubo se precipitó el DNA adicionando 10.5 ml de isopropanol y se centrifugó durante 30 minutos a 15500 rpm en la ultracentrífuga. Transcurrido el tiempo se diluyó la pastilla de DNA con 300 µl agua estéril y se guardó el DNA a -20 °C.

Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La electroforesis del DNA se realizó de la siguiente forma: se preparó un gel de agarosa al 1% con buffer TAE (Tris, ácido acético y EDTA) para preparar el gel, se pesó 1 gr de agarosa y se diluyó en 100 ml de Buffer TAE y se agregó 5 µl de bromuro de etidio al 1%. Se prepararon aproximadamente 500 ml de buffer TAE 1x para correr el gel. Una vez solidificado el gel se cargaron las muestras correspondientes 5 µl de muestra más 1 µl de buffer de carga, esto se corrió a 100 volts durante 40 minutos. Transcurrido el tiempo se observaron los resultados a luz UV.

Transfección con lipofectamina 2000

Las células NIH3T3 se sembraron en cajas de 60mm y se dejaron crecer aproximadamente al 70% de confluencia. En un tubo eppendorf se mezclaron 250 µl de medio RPMI sin suero con 4 µg del plásmido de DNA, en otro tubo eppendorf se mezclaron 250 µl de medio RPMI sin suero con 12 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Se dejaron incubando 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se mezcló el DNA y la Lipofectamina 2000 y se dejó incubar durante 20 minutos. Durante este tiempo se cambió el medio de las células agregando 2ml de medio fresco. Finalmente se agregó gota a gota la mezcla del plásmido y la Lipofectamina a las células y se regresaron al incubador.

Transfección de células con Nucleofector (Amaxa inc)

En cada pozo de una placa de 12 pozos se colocó 1 ml de medio completo con 20% de SFB y se guardó la placa en el incubador para mantener el medio a una temperatura adecuada (37 °C). Previamente se seleccionó el programa a usar (de la lista que incluye el equipo) para el tipo celular. Una vez teniendo el programa, se colocaron 1×10^6 células por transfección y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml, las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 4 minutos posteriormente se resuspendieron las células en 100 µl de una disolución que contiene 9.35 ml de PBS con 1mM de Ca y 1mM de Mg más 20 mM de Hepes, 10 mM de KCl, 10 mM de Glucosa y 25 mM de Manitol, se agregó a la suspensión celular el plásmido correspondiente para cada transfección (5 µg de plásmido de DNA). Posteriormente se transfirió esta mezcla a la celda de electroporación, se colocó la celda en el nucleofector y se transfectaron las células, posteriormente se agregaron 500 µl de medio completo tibio(37 °C) y se transfirieron las células a los pozos de la placa de 12 pozos.

Inmunofluorescencia para detectar la expresión de los receptores en las células transfectadas mediante citometría de flujo

Para determinar si las células transfectadas con el plásmido correspondiente resultaron positivas se realizó una inmunofluorescencia. Para el buffer FACS se utilizó 1g de sacarosa + 0.5 g de BSA en 100 ml de PBS 1X. Una vez teniendo el buffer FACS se colocaron 1×10^6 células por condición en 100 µl de buffer y se añadieron 50 µl de anticuerpo primario (IV.3 para el receptor FcγRIIA y FcγRIIB, 3G8 para el receptor FcγRIIIB y en algunos ensayos utilizamos como control el anticuerpo W6/32 que reconoce las moléculas MHC clase I) en una concentración final de 10 µl/ml y se incubaron 30 minutos en hielo, después de este tiempo se lavaron 3 veces con buffer FACS y se centrifugó a 5000 rpm durante 1 minuto entre cada lavado, terminando los lavados se agregó el anticuerpo secundario FITC-goat anti-mouse IgG incubando las células 30 minutos en hielo,

después de este tiempo se lavó 3 veces con buffer FACS y se centrifugó a 5000 rpm durante 1 minuto entre cada lavado. Finalizando los lavados se adicionaron 300 μ l de paraformaldehído al 1% y las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACScan.

Cultivo y cuidado de las células transfectadas

Las células que resultaron positivas a la transfección fueron seleccionadas en medio de cultivo RPMI suplementado más antibiótico geneticina (G418) en una concentración 500 μ g/ml.

Movilización de Ca²⁺ intracelular

Para registrar la movilización de Ca²⁺ intracelular se siguió el siguiente protocolo:

Las células THP-1 transfectadas con el receptor Fc γ RIIB se resuspendieron a una concentración de 1 x 10⁸ células/ml en PBS 1.5 mM de Mg²⁺ y 1.5 mM Ca²⁺. Las células se incubaron a 37 °C por 5 minutos y se adicionó Fura 2/AM 10 μ l al 1M / ml (Calbiochem cat: 344905). Las células se incubaron a 37 °C por 5 minutos y posteriormente se diluyeron 10 veces con PBS Mg²⁺ y Ca²⁺, para después incubar 20 minutos a 37 °C. Después de este tiempo las células se lavaron con aproximadamente 30 ml de buffer PBS Mg²⁺ y Ca²⁺ caliente (37 °C), centrifugando a 4500 rpm durante 5 minutos y resuspendiendo las células en buffer PBS Mg²⁺ y Ca²⁺ fresco. Las células se incubaron 15 minutos más a 37 °C y transcurrido el tiempo se lavaron con aproximadamente 30 ml de buffer PBS Mg²⁺ y Ca²⁺ y finalmente las células se resuspendieron a 5x10⁶ células/ml en PBS Mg²⁺ y Ca²⁺ a 4 °C.

A esta suspensión de células se agregó el anticuerpo IV.3 para estimular el receptor Fc γ RIIA o el anticuerpo 3G8 para estimular el receptor Fc γ RIIB a una concentración de 10 μ g/ ml. Las células se incubaron por 20 minutos, transcurrido el tiempo se lavaron con buffer PBS Mg²⁺ y Ca²⁺ aproximadamente 4 ml y se centrifugaron a 1200 rpm por 4 minutos. Posteriormente, las células se resuspendieron para tener 2.5x10⁶ células /ml en buffer PBS Mg²⁺ y Ca²⁺ a 4 °C.

Para registrar la movilización de Ca²⁺ intracelular:

Se adicionaron 2 ml de la suspensión celular dentro de la cubeta del espectrofotómetro, y se calentó la cubeta a 37 °C durante 2 minutos, posteriormente se colocó la cubeta dentro del espectrofotómetro y se inició la medición de Ca²⁺ intracelular.

Para estimular el receptor marcado con el anticuerpo correspondiente se adicionó a los 60 segundos de registro el anticuerpo secundario o entrecruzador F(ab)₂ goat-anti-mouse IgG en una concentración final de 60 μ g/ml y se registró la movilización de Ca²⁺ provocada por el estímulo del receptor.

Medición de la activación de NF- κ B por citometría de flujo

Para medir la activación de NF- κ B se siguió el siguiente protocolo:

Para estimular las células THP-1 transfectadas con el receptor Fc γ RIIB se utilizó el anticuerpo 3G8 a una concentración de 10 μ g/ml y se incubó 20 minutos en hielo, posteriormente las células se lavaron con PBS (200 μ l), y luego se resuspendieron con el entrecruzador F(ab)₂ goat-anti-mouse IgG a 60 μ g /ml, y se incubaron a 37 °C por 15 minutos. Después las células se lavaron con PBS

frío y se centrifugaron 3 minutos a 4500 rpm, el sobrenadante se retiró e inmediatamente la pastilla celular se transfirió a un baño de hielo seco por 10 minutos.

Después de esto, las células se resuspendieron en 100 µl de un buffer hipotónico (1.6g de NaCl, 1g de BSA y 20mM de HEPES (1ml) + 1 µl de DTT). Con esto las células se rompen y quedan solo los núcleos. Éstos se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos en frío y el sobrenadante se retiró para fijar los núcleos con 100 µl de paraformaldehído al 4% durante 20 minutos en hielo. Transcurrido el tiempo, los núcleos se centrifugaron a 4500 rpm, se resuspendieron en 100 µl de paraformaldehído al 1% y se guardaron a 4 °C.

Para la detección de NF-kB, los núcleos se centrifugaron 1 minuto a 4500 rpm y el sobrenadante se removió, los núcleos se resuspendieron en 100 µl de tritón al 1% (10 µl tritón 10 % + 990µl de paraformaldehído al 4%) y se incubaron 10 minutos en hielo. Posteriormente los núcleos se centrifugaron 1 minuto a 4500 rpm, el sobrenadante se retiró y los núcleos se resuspendieron en 500 µl de SFB al 4% por 20 minutos en hielo. Después los núcleos se centrifugaron 1 minuto a 4500 rpm, el sobrenadante se retiró y los núcleos se resuspendieron con el anticuerpo anti-NF-kB p50 a 2.5µg/ml y se dejaron reposar en hielo durante 20 minutos. Los núcleos se centrifugaron, el sobrenadante se removió y los núcleos se resuspendieron en 100µl de FITC goat anti- rabbit IgG 1/100 y se incubó 20 minutos en hielo y oscuridad. Pasando el tiempo los núcleos se centrifugaron a 4500 rpm durante 1 minuto, y se resuspendieron en 500µl de SFB al 4% . Posteriormente los núcleos se centrifugaron 3 minutos a 4500 rpm y finalmente se resuspendieron en 300 µl de paraformaldehído 1 % . La fluorescencia asociada a los núcleos se detectó por citometria de flujo.

Estimulación de las células a través de los receptores Fc

Para estimular las células THP-1 transfectadas con el receptor FcγRIIIB se utilizó el anticuerpo primario IV.3 para estimular el receptor FcγRIIA y 3G8 para estimular el receptor FcγRIIIB a una concentración de 10 µg/ ml y se dejaron incubando en hielo durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo se lavaron las células con PBS 1X y se centrifugaron a 4500 rpm durante un minuto para retirar el sobrenadante. Posteriormente se resuspendieron las células en el entrecruzador F(ab)2 goat-anti-mouse IgG en una concentración final de 60 µg/ml y se incubaron a 37°C durante 15 minutos, transcurrido el tiempo se lavaron las células con PBS 1X y se centrifugaron 3 minutos a 4500 rpm para recuperar todas las células, se retiró el sobrenadante y la pastilla se colocó en hielo seco para congelar las células.

Western Blot

Las células se lisaron con 50 µl de buffer RIPA (150 mM NaCl, NP40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0.1%, EDTA 5mM y HEPES 50mM) más inhibidores de proteasas (O-vonodato, complete, PVPP y PMSF). El lisado celular se incubó en hielo durante 10 minutos y posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó en un tubo limpio y se mezcló con 20 µl de buffer de carga (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, Glicerol, SDS 10%, β-mercaptoetanol 10% y azul promofenol 0.05%) , y se calentó a 90 °C durante 5 minutos antes de colocarlo en un gel de acrilamida al 8%. Las proteínas se separaron por electroforesis (se corrieron con 50 mA durante 1.5 horas). Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana PVDF (se

transfirieron con 500 mA durante 1 hora). La membrana se bloqueó con leche al 5% en buffer TBS-T (Tris-base 10mM, NaCl 200mM a pH 8.5 y Tween 20 0.1%) durante toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente: rabbit anti MAPK (ERK-1) a una disolución 1/1000 o mouse monoclonal anti-ERK fosforilado (pERK) a una dilución 1/1000 durante 3 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo las membranas se lavaron con TBS-T 4 veces por 10 minutos cada lavado. Después las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente: goat anti-rabbit IgG marcado con peroxidasa a una dilución 1/3000, o goat anti-mouse IgG marcado con peroxidasa a una dilución 1/3000, durante 1 hora. Después las membranas se lavaron nuevamente 4 veces 10 minutos cada lavado.

Terminados los lavados, las membranas se revelaron utilizando un sustrato quimioluminiscente (Immobilon Western Chemiluminescent HRP sustrate).

Resultados

Obtención de células NIH3T3 (Fibroblastos de ratón) transfectadas con el receptor FcγRIIA o el receptor FcγRIIB

Para la obtención de células NIH3T3 (fibroblastos de ratón) transfectadas con los receptores FcγRIIA o FcγRIIB, los plásmidos pcDNA 3 con el inserto para FcγRIIA o pcDNA 3.1 para el FcγRIIB, se amplificaron y purificaron. Una vez teniendo los plásmidos listos, se procedió a transfectar células NIH3T3 utilizando lipofectamina 2000. Posteriormente estas células se seleccionaron con medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino, glutamina y 500 µg/ml del antibiótico G418 (Geneticina).

Sin embargo al analizar por citometría de flujo si los receptores se habían expresado en la membrana de las células NIH3T3 utilizando el anticuerpo IV.3 (reconoce tanto al receptor FcγRIIA como al FcγRIIB) en una concentración 10µg/ml y FITC-goat anti-mouse (1:400), observamos que las células transfectadas no expresaban los receptores (Figura 8), así mismo utilizando el anticuerpo W6/32 que detecta antígenos leucocitarios humanos (HLA) clase I como control positivo, no observamos la presencia de esta molécula en las células de ratón, lo cual indica que la transfección no funcionó.

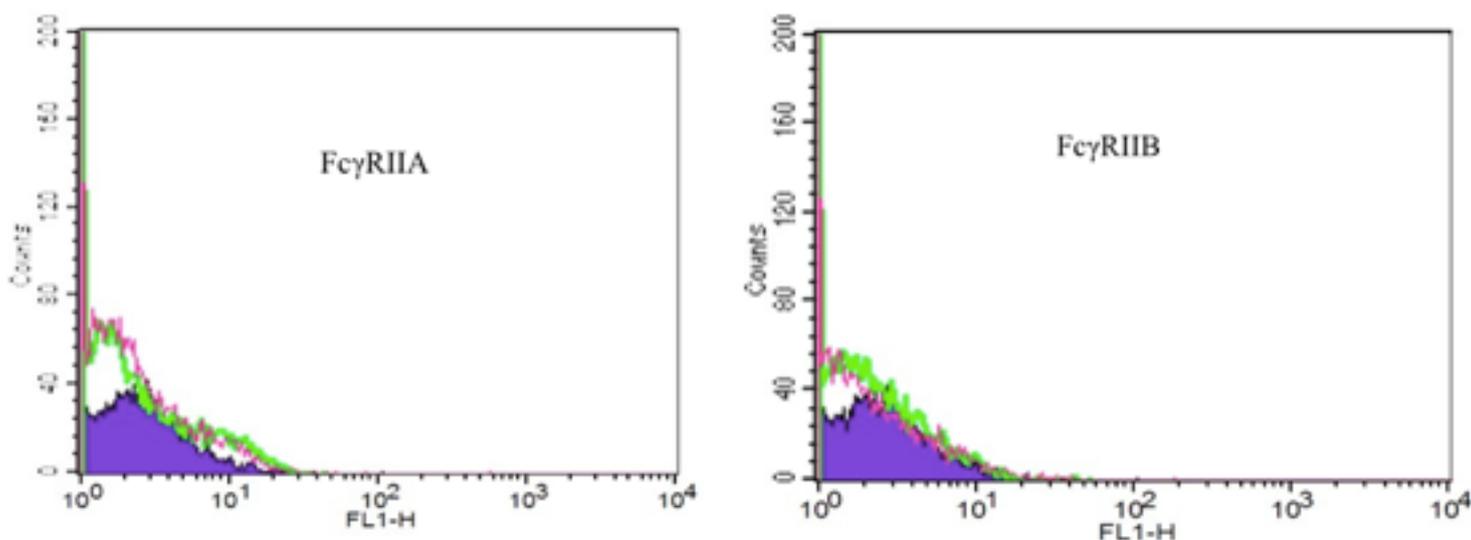


Figura 8.- Inmunofluorescencia de células NIH3T3 transfectadas por lipofectamina 2000 con el plásmido que contiene el inserto de los receptores receptor FcγRIIA o FcγRIIB. En morado control negativo de fluorescencia, en verde anticuerpo IV.3 y FITC y en rosa w6/32 y FITC. Se puede observar en los histogramas que las células transfectadas no expresan los receptores en la membrana.

El resultado anterior se repitió 4 veces, sin embargo en ninguna ocasión los resultados fueron positivos para el receptor FcγRIIB. Sólo para el receptor FcγRIIA se pudo observar un pequeño desplazamiento del histograma correspondiente a las células NIH3T3 marcadas con el anticuerpo IV.3, indicando que las células NIH3T3 estaban expresando el receptor. Estas células inmediatamente se cultivaron bajo la presión de antibiótico G418 500 µg/ml sin embargo la mayoría de las células se murieron y no se pudo rescatar el cultivo debido a que el porcentaje de células positivas era muy pequeño y se fueron perdiendo al experimentar con ellas.

Para descartar que los anticuerpos, los reactivos o la técnica utilizados estuvieran mal, se realizó un control positivo con neutrófilos, ya que estas células expresan el receptor Fc γ RIIA de forma natural y al marcar este receptor con el mismo anticuerpo IV.3 nos daría una señal positiva. La inmunofluorescencia se realizó con los mismos reactivos, anticuerpos y técnica ya descritos. Los resultados indican que todo se encontraba en perfectas condiciones (figura 9) ya que se observa en el histograma resultante la presencia clara de este receptor en estas células.

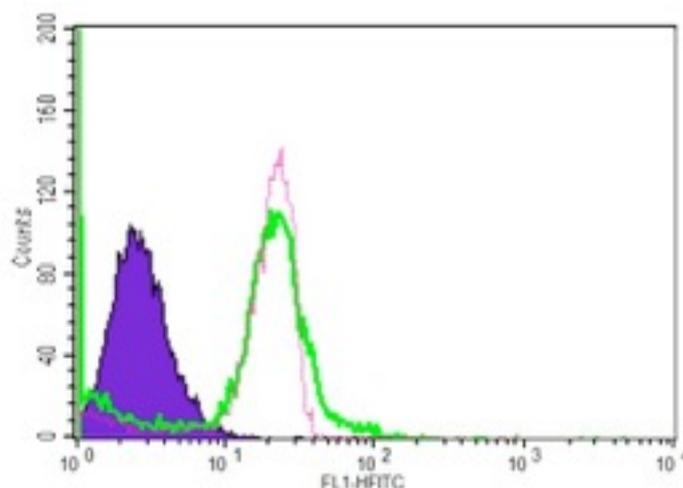


Figura 9.- Inmunofluorescencia para el receptor Fc γ RIIA en neutrófilos como control positivo. En morado control negativo de fluorescencia, en verde anticuerpo IV.3 y FITC y en rosa w6/32 y FITC. Se puede observar en el histograma la presencia del receptor Fc γ RIIA demostrando que los anticuerpos, reactivos y la técnica funcionan bien.

Lo anterior nos sugirió que la transfección con lipofectamina no dió el porcentaje adecuado de células positivas a la transfección, ya que con el receptor Fc γ RIIB no observamos células positivas y con el receptor Fc γ RIIA las células no fueron suficientes para poder mantener el cultivo. Debido a esto cambiamos el método de transfección.

Utilizamos la técnica de electroporación con nucleofector. Para encontrar las mejores condiciones de transfección con esta técnica, se estandarizó utilizando células NIH3T3 y un plásmido con GFP (Proteína verde fluorescente) la cual al formar parte del DNA de la célula y emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible, además este plásmido contaba también con la presencia de un gen de resistencia al antibiótico G418 para seleccionar las células en cultivo. Esto para observar fácilmente al microscopio el porcentaje de células positivas a la transfección y así poder determinar qué condiciones son las mejores. Se probaron diferentes concentraciones del plásmido, condiciones de transfección y diferentes programas del nucleofector para transfectar, ya que este equipo cuenta con diferentes programas para cada tipo celular.

Las células NIH3T3 se transfectaron con el plásmido GFP utilizando el nucleofector bajo las siguientes condiciones: se probaron los diferentes programas con los que contaba el equipo para transfectar células NIH3T3 y se utilizaron 3 μ g de plásmido tal como lo recomienda el equipo. Los diferentes programas fueron: U-030, A-024, D-005 y W-001.

Los programas fueron utilizados bajo las mismas condiciones y reactivos, monitoreando después de las 48 horas de la transfección la cantidad de las células con fluorescencia verde. Los resultados indicaron que el mejor programa para transfectar es el U-030 (figura 10) ya que con este programa se obtuvo una mayor cantidad de células con fluorescencia verde, indicando mayor cantidad de células transfectadas positivamente.

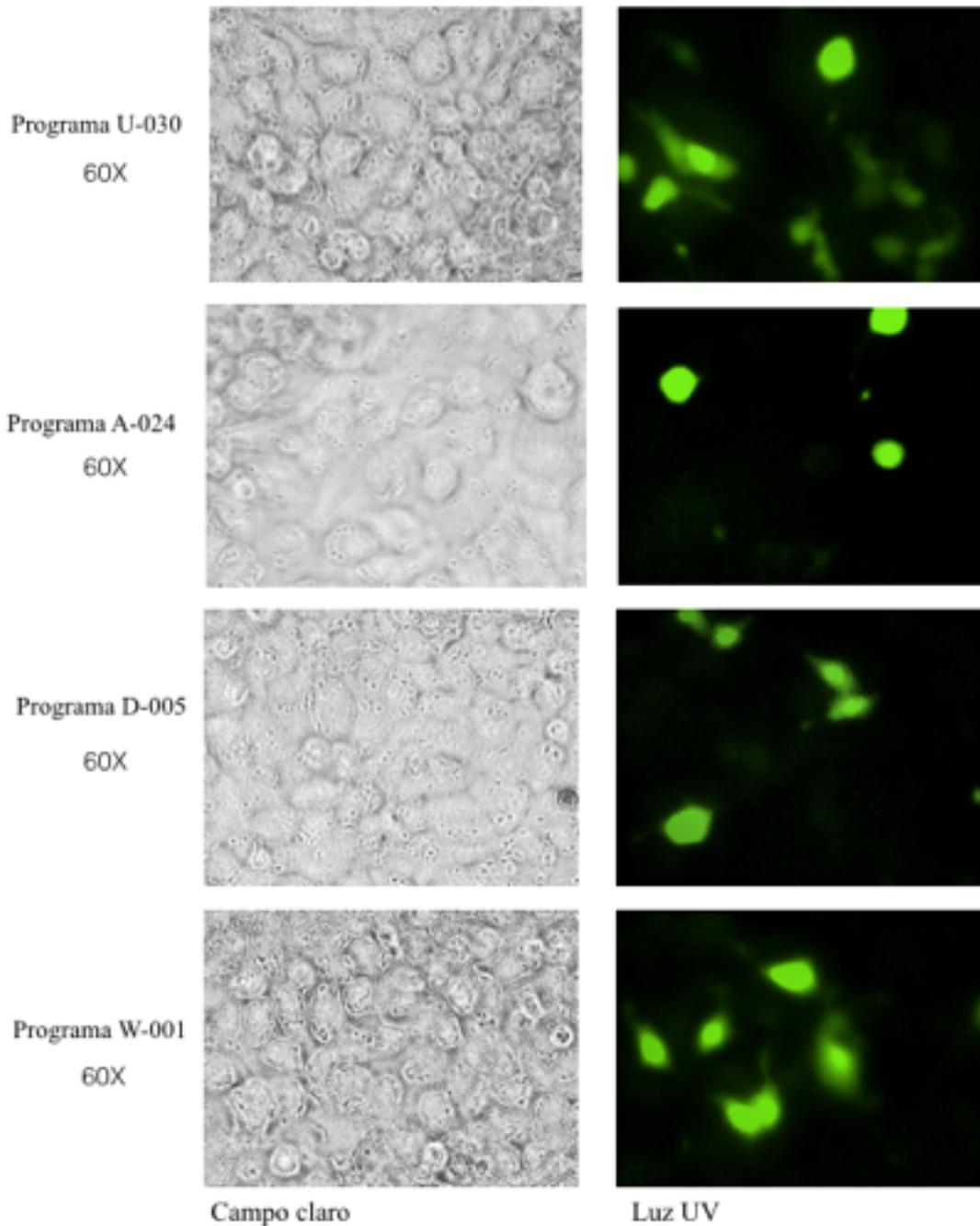


Figura 10.- Transfección de células NIH3T3 por electroporación con nucleofector. Se utilizó un plásmido que contiene GFP para seleccionar el programa con el que se obtenía la mayor cantidad de células positivas a la transfección. Con todos los programas la concentración del plásmido utilizada fue 3 μ g. Los resultados indican que el programa U-030 resultó ser el más eficiente, ya que como se observa en la figura es con el que hay una mayor cantidad de células bioluminiscentes indicando una mayor cantidad de células positivas a la transfección.

Una vez teniendo la certeza de utilizar el programa adecuado se procedió a determinar la cantidad de plásmido que se debía utilizar para obtener una mayor cantidad de células positivas, esto debido a que ya habíamos observado que cuando se someten en cultivo bajo la presión del antibiótico G418 la mayoría de las células tienden a morir tras pocas horas y si se requiere continuar con el cultivo de células positivas se debe partir de la mayor cantidad de células positivas posibles.

Para esto se cambiaron con las cantidades de plásmido utilizado por transfección, se utilizaron 4, 5 y 6 μg por transfección respectivamente y debido a que ya se había determinado que el programa U-030 fue el que mejor funcionó, se utilizó este programa para todas las transfecciones. Los resultados indicaron que la mejor concentración de plásmido fue 5 μg ya que con esta concentración se obtuvo la mayor cantidad de células con fluorescencia verde (Figura 11). Las diferentes condiciones se realizaron el mismo día y los cultivos de estas células se sometieron a la presión del antibiótico G418 después de las 48 horas de ser transfectadas para posteriormente observar la cantidad de células positivas en cada concentración de plásmido (figura 11).

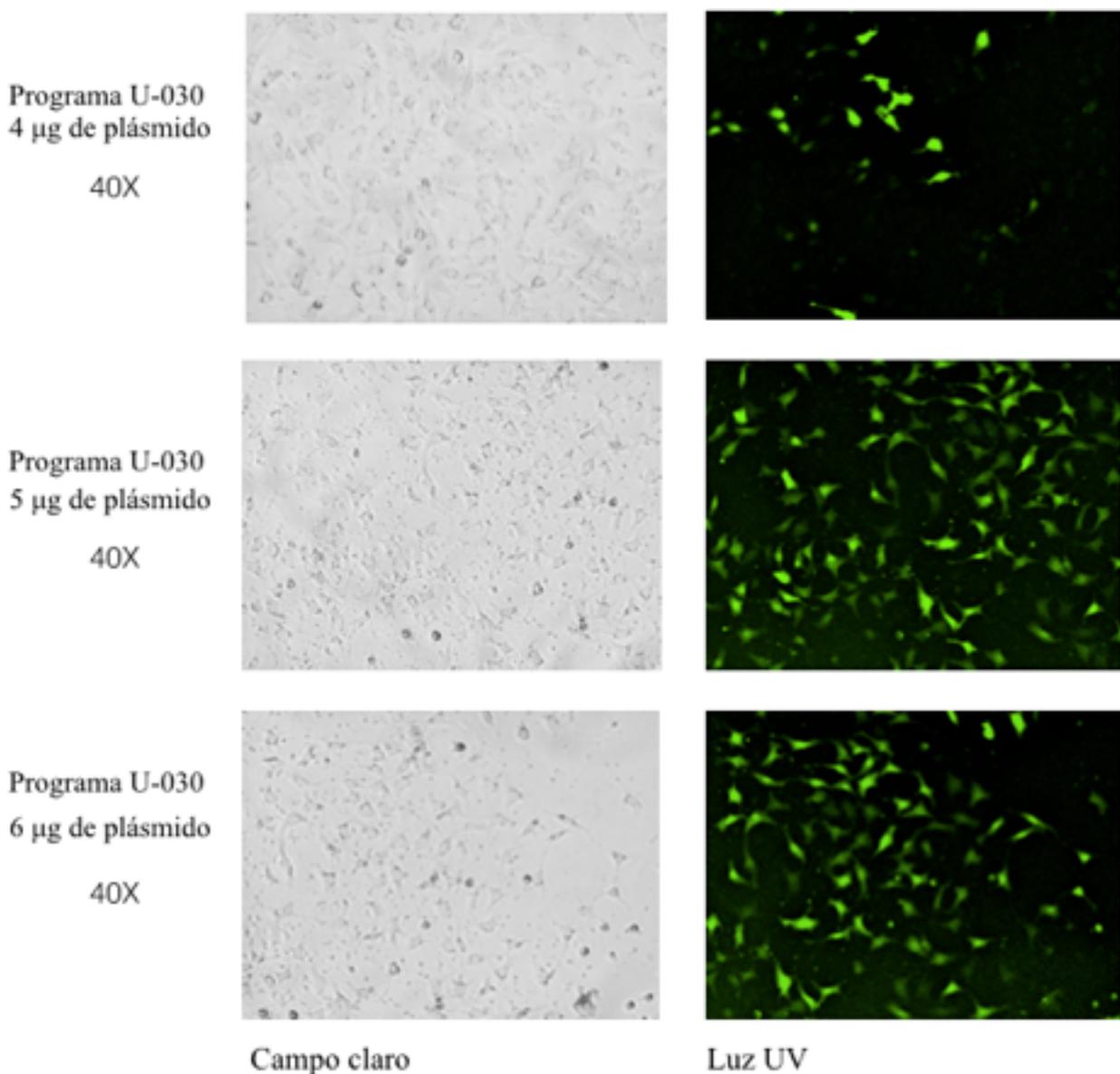


Figura 11.- Transfección de células NIH3T3 por electroporación para determinar la cantidad de plásmido con la que se obtenga mayor cantidad de células positivas. Los resultados indican que 5 μg nos dio la mayor cantidad de células positivas. Las fotografías fueron tomadas después de los 3 días de ser transfectadas.

Para corroborar los resultados, se repitió la transfección de células NIH3T3 con el plásmido que contiene GFP con las condiciones con las que obtuvimos la mayor cantidad de células positivas (con el programa U-030, 5 µg de plásmido y someterlas a la presión del antibiótico después de las 48 horas).

Se monitoreó la cantidad de células bioluminiscentes a los 5 días después de cultivo con la presencia del antibiótico G418 (figura 12) ya que al primer día de cultivarlas con antibiótico se había observado que la mayoría de las células se mueren y para el día 5 ya empiezan a estabilizarse las células positivas. El cultivo de las células positivas se llevó hasta la confluencia bajo la presencia del antibiótico G418 y se fotografió a los días 5, 9 y 12 que finalmente llegó a la confluencia (figura 12). Esto para ver si las células positivas sobrevivían, se dividían y al llegar a la confluencia se contara con un 100% de células positivas y así poder trabajar con las células sin riesgo de perder el cultivo de estas células.

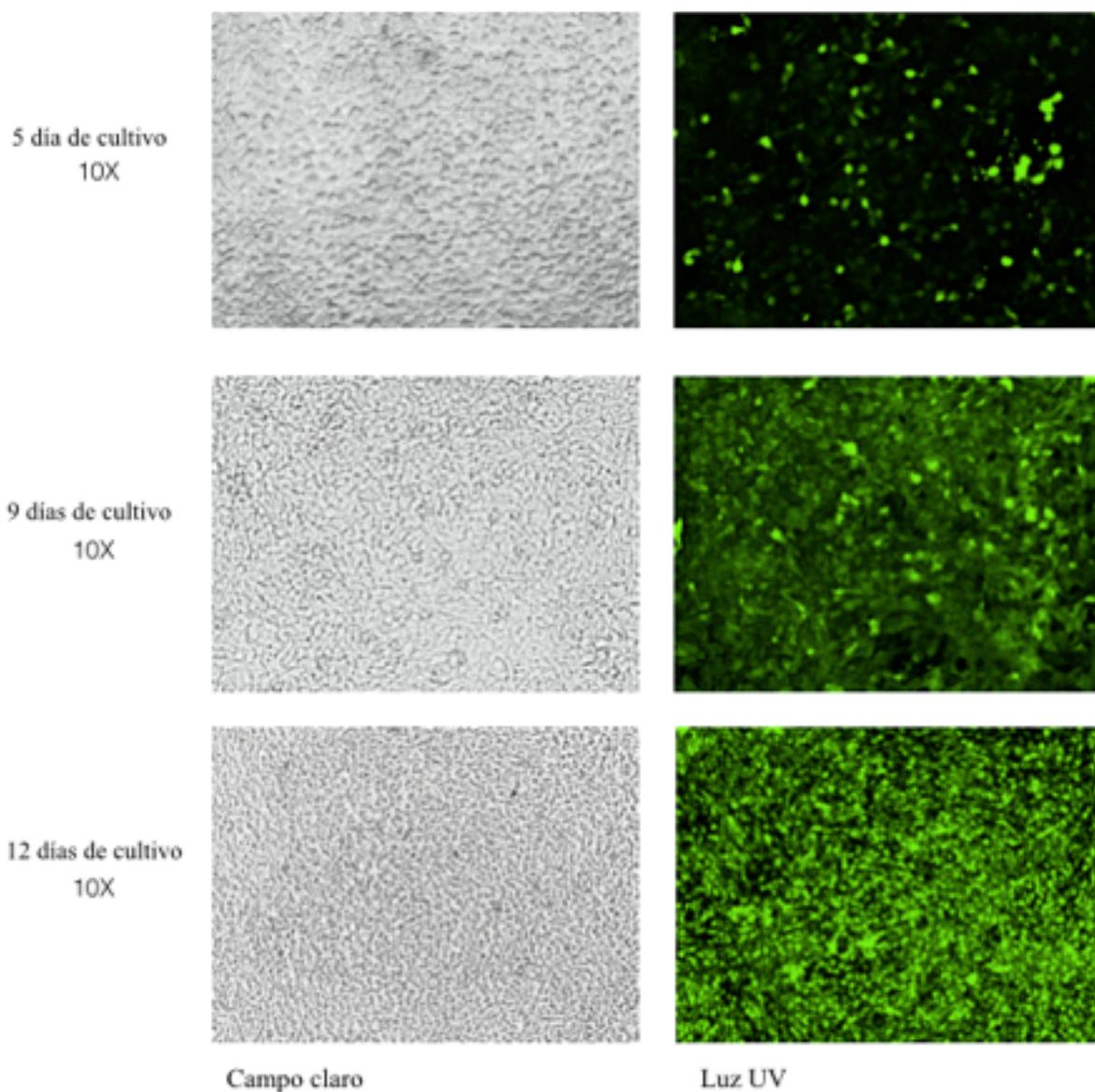


Figura 12.- Transfección de células NIH3T3 para monitorear si las células positivas llegan a confluencia. Se transfectaron con las condiciones óptimas y se cultivaron con la presencia del antibiótico G418 a las 48 horas, posteriormente a los 5 días en cultivo se monitoreó la cantidad de células positivas, después a los 9

días y finalmente a los 12 días que llegaron a la confluencia. Las fotografías indican que las condiciones funcionan de una manera efectiva y que las células positivas a la transfección llegan a confluencia.

Una vez estandarizado el método de transfección con nucleofector, se procedió a transfectar células NIH3T3 con los plásmidos que contienen los insertos para el receptor FcγRIIA o FcγRIIB.

Transfectadas las células, a las 48 horas se les retiró el medio de cultivo y se seleccionaron con medio fresco con antibiótico G418 500 µg/ml. Así mismo alcanzada la confluencia se realizó una inmunofluorescencia para medir la expresión de los receptores mediante citometría de flujo.

Los resultados mostraron que las células transfectadas para el receptor FcγRIIA expresan en receptor en su membrana (Figura 13); estas células fueron expandidas en cultivo y congeladas para su preservación. Sin embargo, las células transfectadas para el receptor FcγRIIB no resultaron positivas a la transfección ya que el histograma demuestra que no se encuentra el receptor en la en su membrana (figura 13). La transfección para obtener las células con el receptor FcγRIIB se repitió dos veces más y en ninguna se obtuvieron resultados positivos.

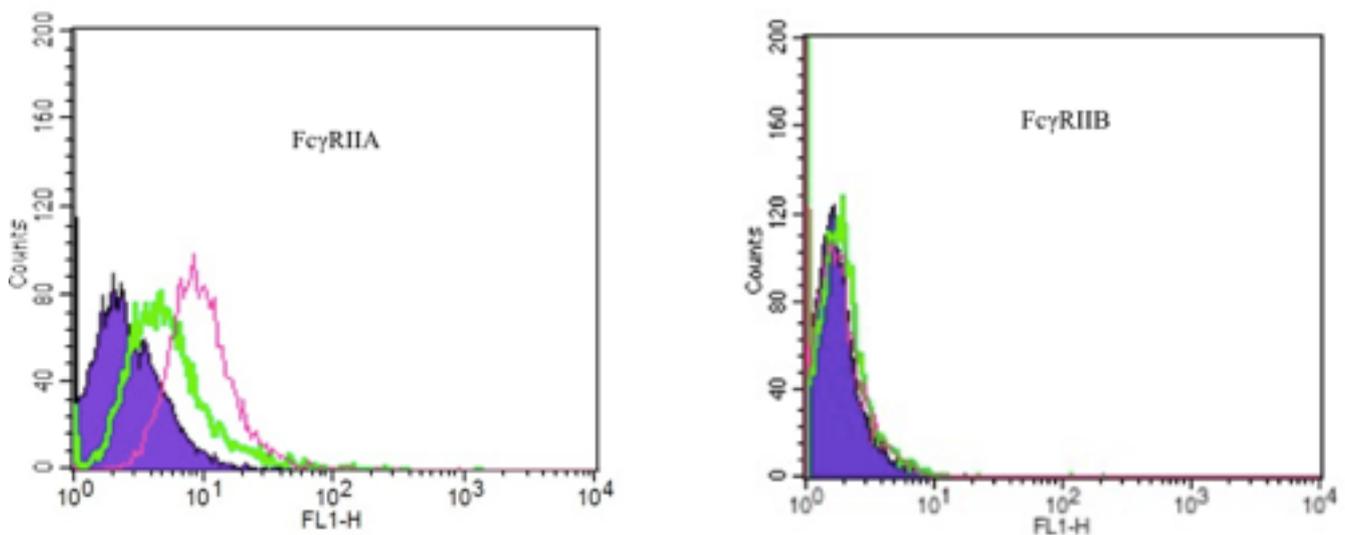


Figura 13.- Inmunofluorescencia para el receptor FcγRIIA y FcγRIIB en células NIH3T3 transfectadas por electroporación. En morado observamos el control de fluorescencia, en rosa células marcadas con el anticuerpo IV.3 y FITC y en verde células marcadas con el anticuerpo W6/32 y FITC. Como se observa en los histogramas solo las células transfectadas con el receptor FcγRIIA lo expresan en su membrana, sin embargo no es así para las células transfectadas para el receptor FcγRIIB.

Debido a que no obtuvimos células NIH3T3 con el receptor FcγRIIB pero si con el receptor FcγRIIA, secuenciamos el plásmido que contenía el gen del receptor FcγRIIB, con la idea de que pudiera estar mal construido o que la secuencia del receptor FcγRIIB no fuera la correcta.

El plásmido se secuenció con la ayuda de la Dra. Laura Ongay en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, utilizando el promotor T7 y se obtuvo la siguiente secuencia:

TACGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCGCCACTGTGCTGGATATCTGCAGAATTCATGCTTCTGTG
GACAGCTGTGCTATTCTGGCTCCTGTTGCTGGGACACCTGCAGCTCCCCAAAGGCTGTGCTG
AAACTCGAGCCCCAGTGGATCAACGTGCTCCAGGAGGACTCTGTGACTCTGACATGCCGGGGGA
CTCACAGCCCTGAGAGCGACTCCATTCACTGGTTCACAATGGGAATCTCATTCCCACCCACACG
CAGCCCAGCTACAGGTTCAAGGCCAACAAACAATGACAGCGGGGAGTACACGTGCCAGACTGGC
CAGACCAGCTCAGCGACCCTGTGCATCTGACTGTGCTTTCTGAGTGGCTGGTGTCTCCAGACCC
CTCACCTGGAGTTCAGGAGGGAGAAACCATCGTGTGCTGAGGTGCCACAGCTGGAAGGACAAGC
CTCTGGTCAAGGCCACATTCTTCCAGAATGGAAAATCCAAGAAATTTCCCGTTCGGATCCCAAC
TTCTCCATCCCACAAGCAAACACAGTCACAGTGGTGATTACCACTGCACAGGAAACATAGGCT
ACACGCTGTACTCATCAAAGCCTGTGACCATCACTGTCCAAGCTCCCAGCTCTTCACCGATGGGG
ATCATTGTGGCTGTGGTCACTGGGATTGCTGTAGCGGCCATTGTTGCTGCTGTAGTGGCCTTGATC
TACTGCAGGAAAAAGCGGATTTCACTCTCCAGGATACCTGAGTGCAGGGAAATGGGAGAGA
CCCTCCCTGAGAAACCAGCCAATCTACTAATCCTGATGAGGCTGACAAAGTTGGGGCTGAGAA
CACAATCACCTATTCACTTCTCATGCACCCGGATGCTCTGGAAGAGCCTGATGACCAGAACCGTA
TTTGAAGCTTAAGTTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTT
GTTTGGCCCTCCCCCG

Así mismo obtuvimos la secuencia de la base de datos de NCBI:

Homo sapiens Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32) (FCGR2B), transcript variant 1, mRNA

agaacatttctttttcacttccccctttcagactccagaatttgtttgcctctagggtagaatccgccaaagctttgagag
aaggctgtgactgctgtgctctggcgccagctcgcctccagggagtgatgggaatcctgtcattcttacctgtccttggc
actgagagtgactgggctgactgcaagtcccccagccttggggtcatatgcttctgtggacagctgtgctattcctggc
tcctgttctgggacacctgcagctcccccaaggctgtgctgaaactcgagcccagtgatcaacgtgctccaggagg
actctgtgactctgacatgcccggggactcacagccctgagagcgactccattcagtggttcacaatgggaatctcatt
cccaccacacgcagcccagctacaggttcaaggccaacaacaatgacagcggggagtagacgtgcccagactggccagac
cagcctcagcgacctgtgcatctgactgtgctttctgagtggtggtgctccagaccctcacctggagttccaggagg
gagaaacctcgtgctgaggtgccacagctggaaggacaagcctctggtcaaggtcacattcttccagaatggaaaatcc
aagaaatttcccgttcggatcccacttctccatcccacaagcaaacacagtcacagtggtgattaccactgcacagg
aaacataggctacacgctgactcatccaagcctgtgacctcactgtccaagctcccagctcttcaccgatggggatca
ttgtggctgtggtcactgggattgctgtagcggccattggtgctgctgtagtgcccttgatctactgcaggaaaaagcgg
atctcagctctcccaggataccctgagtgacgggaaatgggagagaccctccctgagaaaccagccaatcccactaatcc
tgatgaggctgacaaagttggggctgagaacacaatcacctattcacttctcatgacccggatgctctggaagagcctg
atgaccagaaccgtatctagtctccattgtcttgcattgggatttgagaagaaaatcagagaggggaagatctggtatctc
ctggcctaaattcccccttggggaggacagggagatgctgcagttccaaaagagaaggtttcttccagagtcacttacctg
agtctgaagctccctgtcctgaaagccacagacaatgatggtcccaataaaccgactgcaccttctgtgcttcagctctt
cttgacatcaaggctcttccgttccacatccacacagccaatccaattaatcaaaccactgttattaacagataatagca
acttgggaaatgcttatgtttacaggttacgtgagaacaatcatgtaaatctatgatgatttcagaaatgttaaaatagact
aacctctaccagcattataaagtattgtttctgggtgataaaattattgatgatttttattttctttatttttctata
aagatcatatattacttttataataaaacattataaaaacaacattctgtttaccttttcaaggctgtattggttggagt
gtagactgaactgctgggctctgtttctcttcagtgatgagactcttaggaaggcaggaatggataggatagggggagg
agaggagagtggggatttagaatgtagagtgagtgccccttttcttaaaactgaatacagtcacgcaccacataatgatg
tttagttcaacaacagactgcatatgatggtgatccataaaattataataccatatttctattgtacctttctatt
cctatgttttagatataatgagtaacttaccattgtgttacaattgcctaaagtattcagtagcagtagcatgctgtacaggtt
ttagcctaggggcaataggctatacgtacagcctagggtgtgtagtaggacacaccatttaggtttgtataagtaacctg
ctatgatggttcacacaacaaattgctgcatttctcaaaatgatcccatatttcaacaatgatgactgtactcttc
tgccaatgacctgtattctgtttccatgtcttcttcttcttcttctcctatggcaataaaacactgttttgcaacacaa
aaaaaaaaaaaa

La región en verde es la secuencia del gen que codifica para la proteína del receptor FcγRIIB y en rosa resalto el codon de inicio. La secuencia de la proteína del receptor es la siguiente:

MGILSFLPVLATESDWADCKSPQWGHMLLWTAFLVFLAPVAGTPAAPPKAVLKLEPQWINVLQEDSVTLTCRGTSPESD
SIQWFHNGNLIPTHTQPSYRFKANNNDSEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLQTPHLEFQEGETIVLRCHSWKDKPL
VKVTFQNGKSKKFSRSDPNFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTYLSSKPVTITVQAPSSSPMGIIVAVVTGIAVAAIIVA
VVALIYCRKKRISALPGYPECREMGETLPEKPANPTNPDEADKVGAGENTITYSLLMHPDALEEPDDQNR

Analizamos la secuencia resultante de nuestro plásmido en NCBI/BLAST para verificar que fuera la secuencia del receptor FcγRIIB. Los resultados indicaron que efectivamente se alinea con la secuencia del receptor FcγRIIB, sin embargo analizándola faltan algunos nucleótidos que codifican para la proteína y además hay 3 Gaps que probablemente estén cambiando el marco de lectura:

TACGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCACTGTGCTGGATATCTGCAGAATTCATGCTTCTGTG
GACAGCTGTGCTATTCCTGGCTCCTGTTGCTGGGACACCTGCAGCTCCCCAAAGGCTGTGCTG
AAACTCGAGCCCCAGTGGATCAACGTGCTCCAGGAGGACTCTGTGACTCTGACATGCCGGGGGA
CTCACAGCCCTGAGAGCGACTCCATTCACTGGTTCACAATGGGAATCTCATTCCCACCCACACG
CAGCCCAGCTACAGGTTCAAGGCCAACAAATGACAGCGGGGAGTACACGTGCCAGACTGGC
CAGACCAGCCTCAGCGACCCTGTGCATCTGACTGTGCTTTCTGAGTGGCTGGTGTCTCCAGACCC
CTCACCTGGAGTTCAGGAGGGAGAAACCATCGTGCTGAGGTGCCACAGCTGGAAGGACAAGC
CTCTGGTCAAGGCCACATTCTCCAGAATGGAAAATCCAAGAAATTTCCCGTTCGGATCCCAAC
TTCTCCATCCCACAAGCAAACACAGTCACAGTGGTGATTACCACTGCACAGGAAACATAGGCT
ACACGCTGTACTCATCAAGCCTGTGACCATCACTGTCCAAGCTCCAGCTCTTACCAGATGGGG
ATCATTGTGGCTGTGGTCACTGGGATTGCTGTAGCGGCCATTGTTGCTGCTGTAGTGGCCTTGATC
TACTGCAGGAAAAGCGGATTTCACTCTCCAGGATACCCTGAGTGCAGGAAATGGGAGAGA
CCCTCCCTGAGAAACCAGCCAATCTCACTAATCCTGATGAGGCTGACAAAGTTGGGGCTGAGAA
ACAATCACCTATTCACTTCTCATGCACCCGGATGCTCTGGAAGAGCCTGATGACCAGAACCGTA
TTTAGAAGCTTAAGTTTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTT
GTTTGGCCCTCCCCCG

En la secuencia de arriba, resultante de nuestro plásmido, en rojo resalto los nucleótidos que se alinean con la secuencia del receptor FcγRIIB. Sin embargo, faltan algunos nucleótidos para la proteína completa y en verde los 3 nucleótidos que no corresponden a la secuencia y por lo tanto la lectura no es continua.

En la siguiente secuencia que es la que obtuvimos de NCBI resalto en verde los nucleótidos que faltan en la secuencia de nuestro plásmido y en rojo los que si se alinean aunque con 3 gaps. Por lo tanto cuando se traduce a la proteína en la secuencia de aminoácidos faltan algunos (marcados en azul en la cadena de aminoácidos de nuestro receptor de interés arriba mencionada) y además tenía dos aminoácidos cambiados (marcados en rojo de la cadena de aminoácidos arriba mencionada, los cuales podrían estar cambiando el marco de lectura.)

gggagtgatgggaatcctgtcattcttacctgtccttgccactgagagtgactgggctgactgcaa
gtccccccagccttggggatcatatgcttctgtggacagctgtgctattcctggctcctggtgctgg
gacacctgcagctccccaaaggctgtgctgaaactcgagccccagtgatcaacgtgctccagga
ggactctgtgactctgacatgcccgggggactcacagccctgagagcgactccattcagtggtcca
caatgggaatctcattcccaccacacgcagcccagctacaggttcaaggccaacaacaatgacag
cggggagtacacgtgccagactggccagaccagcctcagcgaccctgtgcatctgactgtgctttc
tgagtggctggtgctccagaccctcacctggagttccaggaggagaaaccatcgtgctgaggtg
ccacagctggaaggacaagcctctggtcaaggtcacattcttccagaatggaaaatccaagaatt
ttcccgttcggatcccaacttctccatcccacaagcaaacacagtcacagtggtgattaccactg
cacaggaaacataggctacacgctgtactcatcaagcctgtgaccatcactgtccaagctcccag
ctcttaccgatggggatcattgtggctgtggtcactgggattgctgtagcggccattggtgctgc
tgtagtggccttgatctactgcaggaaaaagcggatctcagctctcccaggataccctgagtgca
ggaaatggggagagaccctccctgagaaaccagccaatcccactaatcctgatgaggctgacaaagt

tggggctgagaacacaatcacctattcacttctcatgcaccggatgctctggaagagcctgatga
ccagaaccgtatttagtctccattgtcttgcattgggatttgagaagaaaatcaga

Con estos resultados podemos decir que el plásmido que tenemos para transfectar las células está defectuoso en cuanto a los nucleótidos que codifican para el receptor FcγRIIB lo cual explicaría porque no obtuvimos células NIH3T3 que expresaran el receptor FcγRIIB. Sin embargo al momento de seleccionarlas con el antibiótico G418, las células proliferan lo que indica que la transfección sí funcionó, debido a que el plásmido contiene resistencia al antibiótico por lo que las células no mueren en cultivo, pero el receptor FcγRIIB no se encuentra en las células debido a que la secuencia que codifica para dicho receptor está defectuosa.

Construcción de un plásmido que contenga el cDNA que codifique para el receptor FcγRIIB

Para la obtención de un plásmido con el receptor FcγRIIB funcional compramos un plásmido para asegurarnos que ahora sí tendremos uno con la secuencia correcta. Se compró el plásmido pCMV6-XL5 de ORIGENE con el inserto para el receptor FcγRIIB. Sin embargo, este plásmido no tiene resistencia a geneticina (G418) para seleccionarlas en cultivo. Es por eso que a su vez adquirimos otro vector que contiene resistencia a G418 el pCMV6-Neo, por lo que separamos el inserto FcγRIIB del plásmido pCMV6-XL5 y lo insertamos al vector pCMV6-Neo para obtener un plásmido con la secuencia de FcγRIIB y además con la resistencia al antibiótico G418.

*El pCMV6-XL5 contiene el inserto correspondiente al receptor FcγRIIB clonado entre los sitios de restricción Eco R1 y Sal 1. Este plásmido tiene presente dos sitios Not 1, una vez antes de Eco R1 y una vez después del sitio Sal 1. Por lo tanto el cDNA de FcγRIIB puede ser removido del plásmido usando la enzima Not 1.

Así mismo el pCMV6-Neo también puede ser cortado con la enzima Not1 y una vez abierto, aquí es donde reconocerá el inserto FcγRIIB, por lo que al hacer la ligación tendremos un plásmido con resistencia a G418 y con el cDNA FcγRIIB.

Tamaños moleculares pb:

| | |
|----------------------|------|
| pCMV6-XL5 | 4482 |
| PCMV6-Neo | 5838 |
| Inserto cDNA FcγRIIB | 1600 |

1.- se transformaron bacterias *E.coli* cepa DH5α con los plásmidos pCMV6-XL5 y pCMV6-Neo

Estas bacterias se sembraron en placas de agar con ampicilina, ya que los plásmidos tienen el gen de resistencia a este antibiótico. Se sembraron:

- * Una placa sin antibiótico + bacterias competentes (las bacterias crecieron en toda la placa)
- * Una placa con antibiótico + bacterias competentes (no crecieron colonias de bacterias)
- * Una placa con antibiótico + bacterias competentes con el plásmido pCMV6-XL5 (si crecieron bacterias en colonias)
- * Una placa con antibiótico + bacterias competentes con el plásmido pCMV6-Neo (si crecieron bacterias en colonias)

2.- Purificación de los plásmidos por Mini -Prep con un kit de la compañía QIAGEN .

Una vez crecidas las colonias de bacterias se sembraron en medio LB para obtener cultivo saturado. Se usaron 9 ml de cultivo saturado con los plásmidos pCMV6-XL5 y pCMV6-Neo y se purificaron los plásmidos

3.- Electroforesis del DNA en gel de Agarosa al 1%.

Para corroborar que los plásmidos purificados fueran los correctos y estuvieran en condiciones optimas, se realizó una digestión de ambos plásmidos pCMV6-XL5 y pCMV6-Neo con la enzima EcoR1 ya que esta enzima corta una sola vez ambos plásmidos y por lo tanto los hace lineales para observar que realmente tengan el tamaño molecular adecuado, se corrieron en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (figura 14) y se observó que tuvieron los tamaños moleculares adecuados (pCMV6-XL5 = 4482 pb y pCMV6-Neo = 5838 pb). En el gel se comprobó que efectivamente ambos plásmidos tienen los tamaños moleculares esperados indicando que se purificaron bien y que están buen estado.

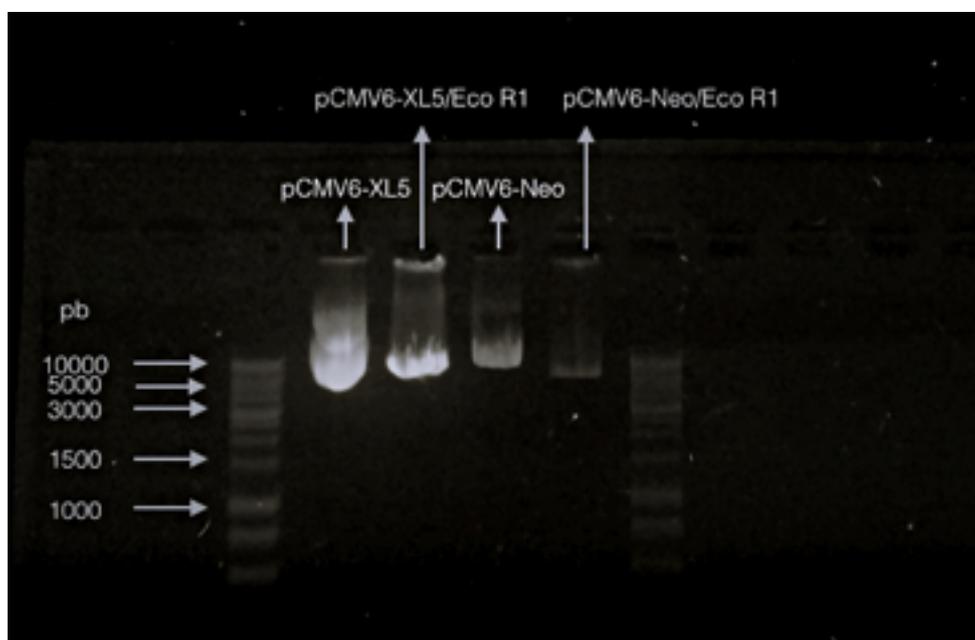


Figura 14.- Electroforesis en gel de agarosa para los plásmidos pCMV6-XL5 y pCMV6-Neo. Ambos plásmidos se digirieron con la enzima Eco R1 para hacerlos lineales y observar que tengan los tamaños moleculares esperados.

4.- Digestión del plásmido pCMV6-XL5 con la enzima de restricción Not 1.

Sabiendo que los plásmidos están en buen estado y que son funcionales, se procedió a cortar el pCMV6-XL5 con la enzima Not 1 la cual separa el inserto del cDNA FcγRIIB del resto del plásmido tal como se mencionó en material y métodos.

Después de la digestión, el plásmido se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% para verificar que el fragmento se haya separado correctamente y que haya una banda que corresponda al inserto de 1600 pb. El resultado indica que la enzima Not 1 separa efectivamente el inserto del cDNA FcγRIIB del resto del plásmido (figura 15) ya que aparece una banda de 1600 pb correspondiente a este cDNA separada del resto del plásmido.

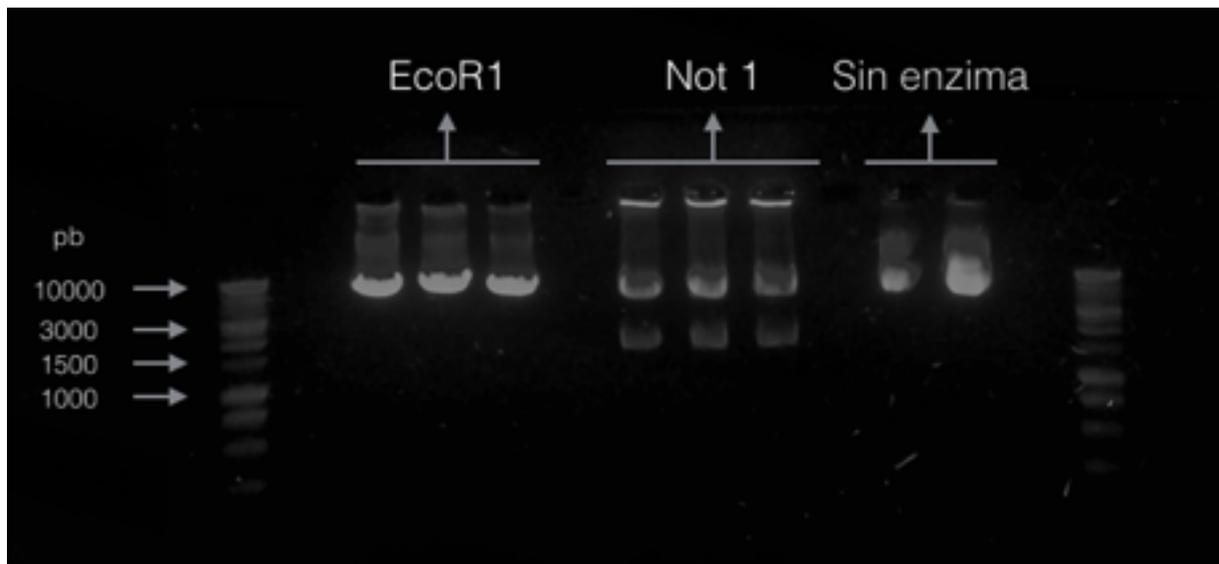


Figura 15.- Digestión del plásmido pCMV6-XL5 con la enzima de restricción Not 1. Se observa que efectivamente se separa el inserto del cDNA Fc γ RIIB del resto del plásmido con un tamaño de 1600 pb. También se observa en el gel que con la enzima Eco R1 el plásmido se hace lineal y se aprecia mejor comparándolo con el plásmido sin digerir (sin enzima).

5.- Electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión.

Estando seguros de que con la enzima Not 1 se separa el inserto de forma correcta se realizó una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión, debido a que este tipo de agarosa permite extraer de forma más pura el fragmento de DNA de interés. Para esto se hizo la digestión del plásmido pCMV6-XL5 con la enzima Not 1.

Al someter a una electroforesis los productos de la digestión, se observa que se separó correctamente (figura 16) quedando una en la banda de 1600 pb correspondiente al inserto del cDNA Fc γ RIIB, las bandas correspondientes al inserto cDNA Fc γ RIIB se cortaron cuidadosamente con un bisturí, se colocaron en tubos eppendorf y se guardaron a 4°C para posteriormente separar este DNA del resto del gel y así poder quedarnos únicamente con el cDNA Fc γ RIIB puro.

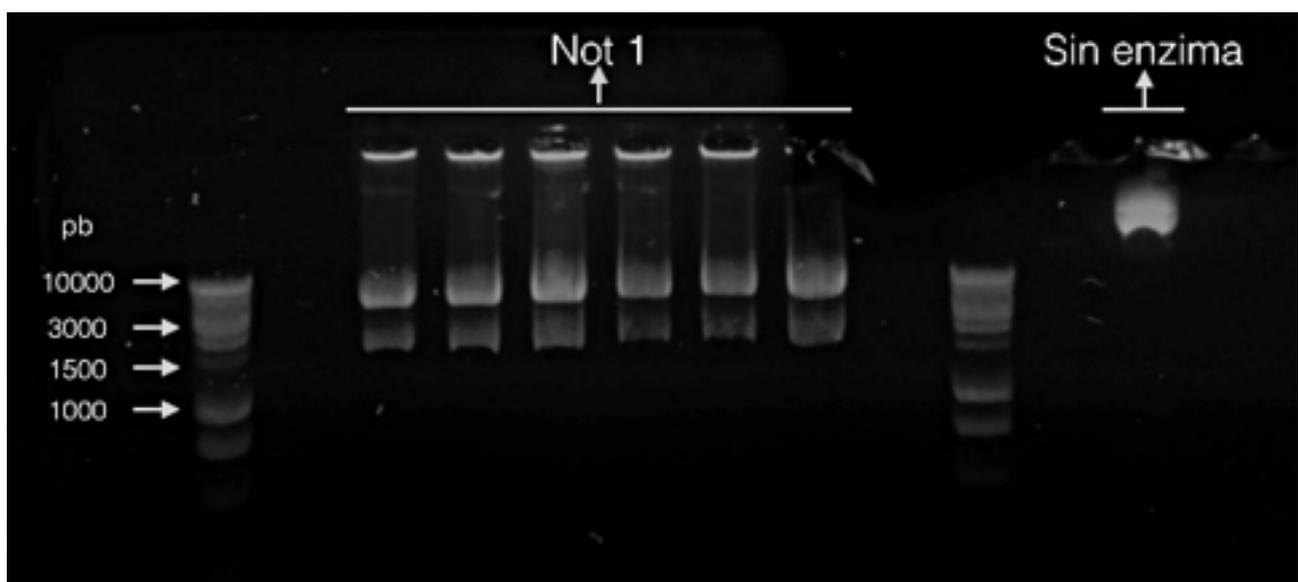


Figura 16.- Electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión para separar el inserto del cDNA Fc γ RIIB. se realizó una digestión del plásmido pCMV6-XL5 con la enzima Not 1 y se sometió a una

electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión para posteriormente cortar las bandas correspondientes al inserto y separarlas del gel.

6.- Purificación del DNA correspondiente al inserto cDNA FcγRIIB mediante QIAEX II Gel extraction kit.

Del fragmento del gel de bajo punto de fusión que cortamos se purificó el cDNA FcγRIIB y posteriormente se cuantificó en un Nanodrop obteniendo 62.5 ng/μl. Para asegurarnos que efectivamente esas cantidades de DNA correspondían al inserto cDNA FcγRIIB se corrió en un gel de agarosa al 1% (figura 17) y observamos efectivamente una sola banda de 1600 pb indicando que la purificación del inserto fue correcta.

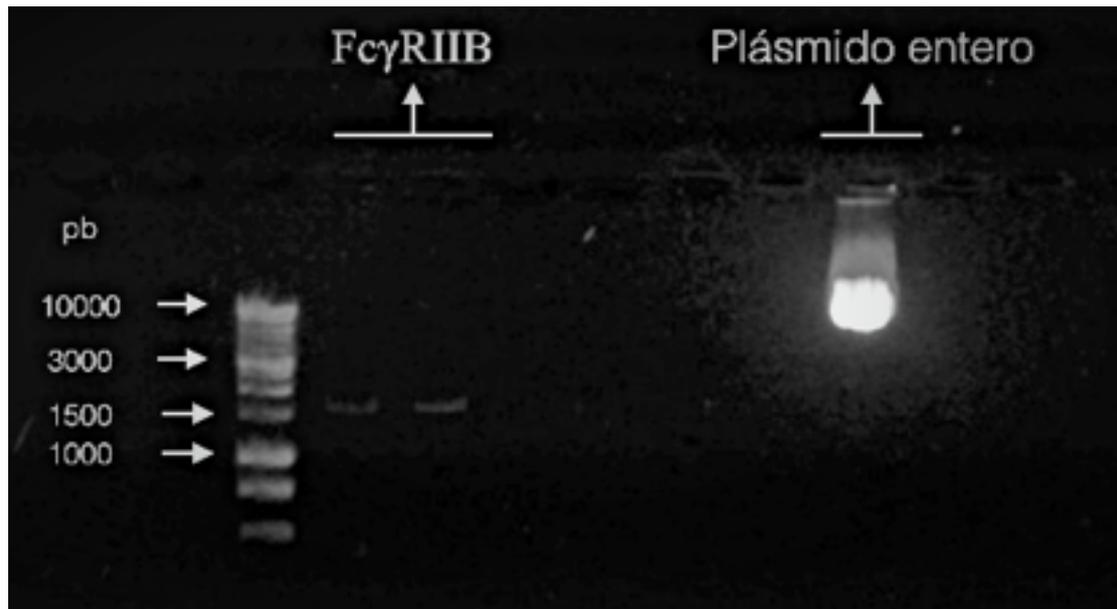


Figura 17.- Electroforesis del cDNA FcγRIIB purificado del gel de bajo punto de fusión. Como se observa en la figura las bandas correspondientes al cDNA FcγRIIB caen en 1600 pb indicando que se purificó de manera correcta el inserto, así mismo en la figura se observa el plásmido sin cortar para ver la diferencia entre las bandas.

7.- Ligación del inserto cDNA FcγRIIB con el vector pCMV6-Neo.

Para poder ligar el inserto en el vector pCMV6-Neo primero se hizo la digestión del vector con la enzima Not I, (Not I corta dos veces el vector en el sitio de clonación múltiple y en este sitio es donde se ligará el inserto). Una vez cortado el vector y teniendo el inserto puro, se realizó la ligación utilizando la enzima ligasa. Esta ligación se amplificó en bacterias competentes (*E. coli* de la cepa DH5α) para posteriormente purificar el plásmido de interés con el inserto cDNA FcγRIIB y además con el gen de resistencia al antibiótico G418 para seleccionar las células en cultivo.

La transformación de las bacterias con la ligación del vector y el inserto se sembró en placas de agar con los respectivos controles (Figura 18)

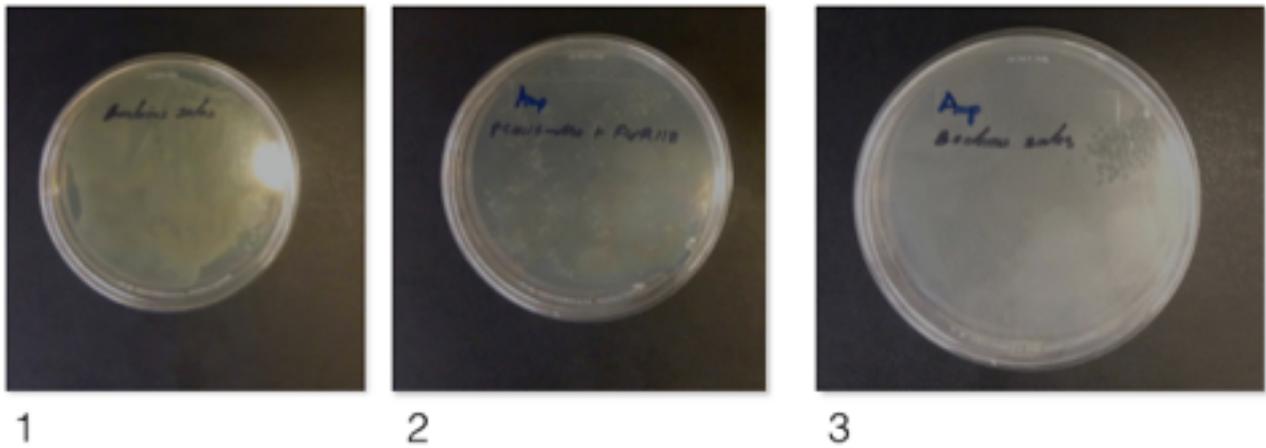


Figura 18.- 1. Placa de agar sin antibiótico y con bacterias competentes sin transformar (las bacterias deben crecer en toda la placa) 2 .Placa de agar con ampicilina y bacterias competentes transformadas con el plásmido ligado (deben crecer las colonias de bacterias con nuestro plásmido de interés)3. Placa de agar con ampicilina y bacterias competentes sin transformar (no deben de crecer bacterias en la placa)

Tal como se observa en las placas las colonias de bacterias esperadas crecieron de la manera correcta, indicando la ligación del plásmido pCMV6-Neo con el inserto. Sin embargo, ahora existe la posibilidad de que en algunas colonias la ligación pudieron haber quedado con el inserto de forma errónea (al revés) y en otras de forma correcta, por lo cual para estar seguros de tener una colonia con el inserto ligado de forma correcta, se tomaron al azar cuatro colonias de la placa de agar las cuales se crecieron en 5 ml de medio LB para obtener un cultivo saturado y posteriormente purificar estos plásmidos por miniprep.

Para corroborar que estos plásmidos purificados realmente tienen el inserto ligado, se realizó una digestión con la enzima Eco R1 (corta una sola vez el plásmido) y se realizó una electroforesis en un gel de agarosa (figura 19) para ver si el tamaño molecular corresponde a 7438 pb ya que este es el tamaño que debería tener el nuevo plásmido ligado con el inserto. En el gel nos dimos cuenta de que las colonias 1 no tiene el tamaño esperado, tiene aproximadamente 5000 pb indicando que no hay inserto en esta colonia, las colonias 2, 3 y 4 si tienen el tamaño esperado indicando que estas colonias si tienen el inserto ligado.

Así mismo para ubicar la colonia con el inserto ligado de manera correcta se hizo un análisis de restricción para encontrar una enzima que cortara tanto el inserto como el vector de forma dispareja y así al hacer la digestión con la enzima, en un gel de agarosa se observen bandas diferentes entre las colonias con el inserto en la forma correcta y las colonias con el inserto de forma incorrecta.

Buscando todas las enzimas posibles encontramos que la enzima Pst 1 corta dos veces el inserto, una vez en 1107 pb y otra vez en 1714 pb y además corta una vez el vector en 3904 pb por lo que al hacer una digestión de los plásmidos purificados con esta enzima se observaran 3 bandas en el gel; una a las 4641 pb, otra a las 2190 pb y otra a las 607 pb para el vector ligado con el inserto de forma correcta y para el vector ligado con el inserto de forma incorrecta se observaran 3 bandas; una a las 5667 pb, otra a las 1467 pb y otra a las 607 pares de bases.

Teniendo la certeza de estar utilizando la enzima correcta para resolver este problema se hizo una digestión de los plásmidos purificados y sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (figura 19) los resultados muestran que solo las colonias 2 y 4 dan las 3 bandas esperadas y las bandas de ambas colonias tienen los tamaños moleculares esperados para el vector con el inserto ligado de forma correcta.

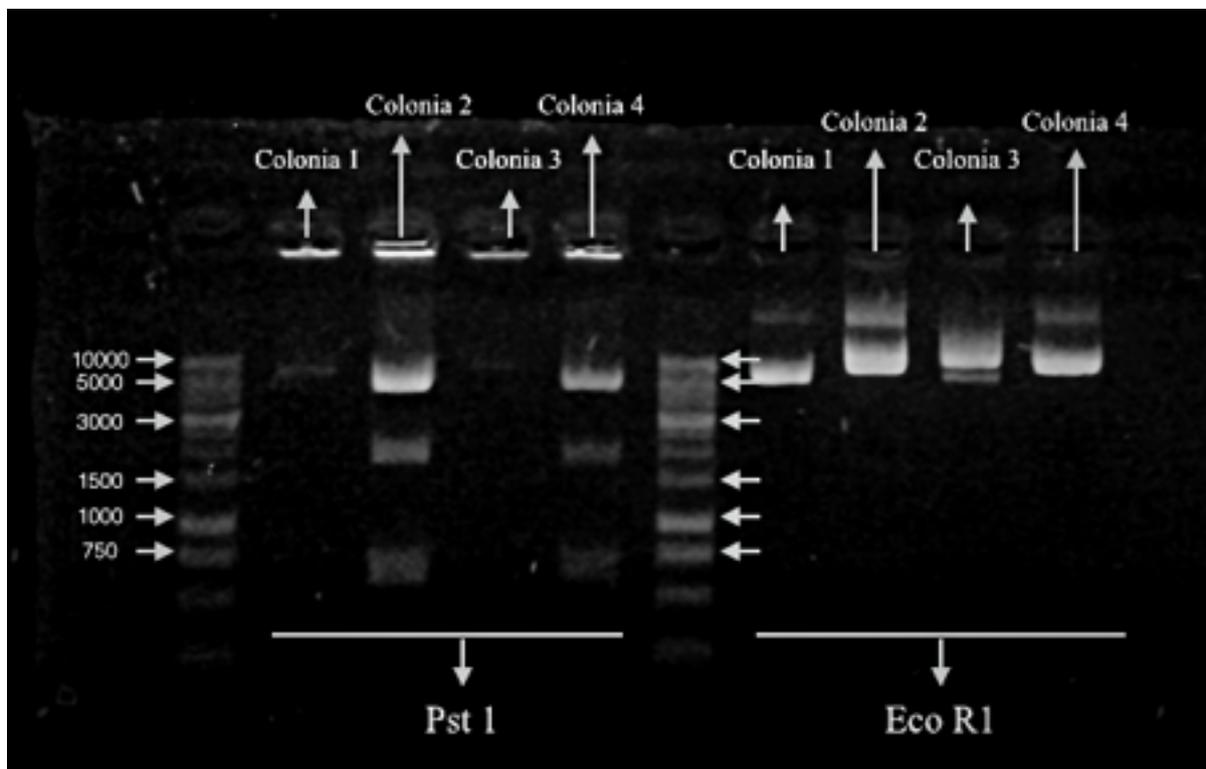


Figura 19.- Digestión de los plásmidos ligados y purificados con la enzima Pst 1 y Eco R1. Se observa que con la enzima Eco R1 solo se corta una vez y se hace lineal para descender en el tamaño molecular al que corresponde. De las 4 colonias se observa que únicamente la colonia 1 no tiene el tamaño esperado indicando que esta colonia no ligo de forma correcta el inserto.

Así mismo con la enzima Pst 1 se observa que únicamente las colonias 2 y 4 dan las 3 bandas esperadas para el inserto ligado de forma correcta, sin embargo las colonias 1 y 3 no dan las bandas esperadas.

De las dos colonias resultantes con el inserto ligado de forma correcta se eligió la colonia 2 para amplificar el plásmido por maxi prep, se realizó un cultivo saturado y se purificó el plásmido; una vez purificado se hizo una digestión del mismo con las enzimas Pst 1, Not 1 y Eco R1 para estar seguros de tener el plásmido correcto y con el vector de ligado de forma correcta.

Pst-1: se obtienen 3 bandas, a las 4641, 2190 y 607 pares de bases.

Eco R1: corta una sola vez el plasmado y se verá solo una banda a los 7438 pares de bases

Not 1: corta el plásmido 2 veces y separa el inserto del DNA deseado (cDNA FcγRIIB)

posteriormente estas digestiones se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Figura 20) para verificar que al cortar este plásmido con estas enzimas den las bandas con los tamaños esperados respectivamente. Los resultados muestran que efectivamente este plásmido da las bandas esperadas y que tiene el inserto ligado en una forma correcta ya que con la enzima Not 1 se separa el inserto del cDNA FcγRIIB y con la enzima Pst 1 da tres bandas con los tamaños correspondientes a los 3 cortes de esta enzima al tener el inserto ligado en la posición correcta.

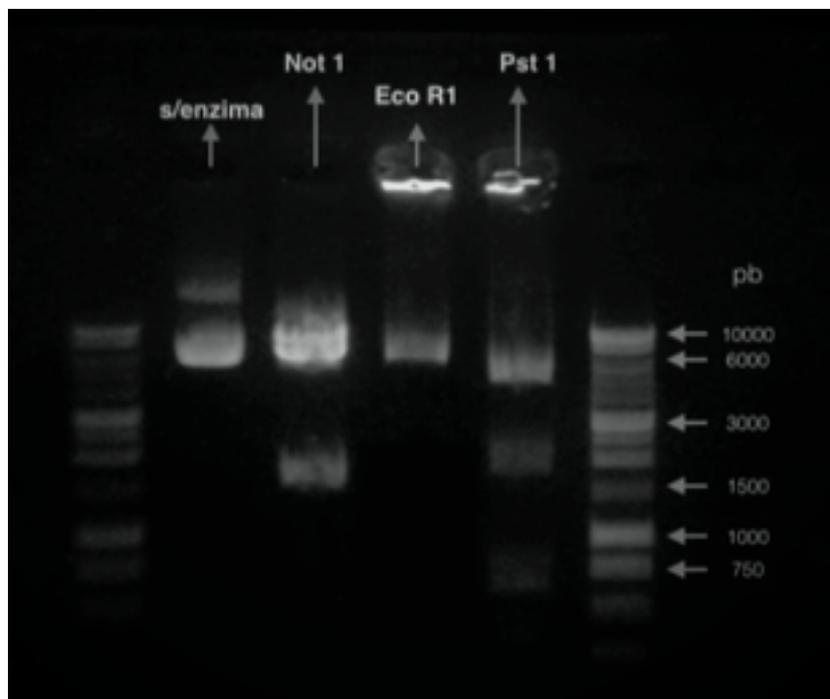


Figura 20.- Digestión del plásmido con el inserto ligado de forma correcta con las enzimas Not 1, Eco R1 y Pst 1. Se observa en el gel que todas las enzimas dan las bandas con los tamaños correctos y con la enzima Not 1 se separa el inserto del cDNA FcγRIIB, así mismo al cortarla con la enzima Pst 1 da las tres bandas con los tamaños esperados al tener el inserto ligado de forma correcta.

Teniendo ahora si un plásmido bien construido con el inserto del cDNA FcγRIIB y además con un gen de resistencia al antibiótico G418, se procedió a transfectar células NIH3T3.

Transfección de células NIH3T3 con FcγRIIB utilizando nucleofector

Se realizaron 4 transfecciones diferentes y las células se dejaron en cultivo.

Una vez transfectadas las células, a las 48 horas se les retiró el medio de cultivo y se agregó medio RPMI suplementado más antibiótico G418 500 µg/ml para seleccionarlas. Posteriormente cuando alcanzaron la confluencia se realizó una inmunofluorescencia a las diferentes transfecciones utilizando el anticuerpo IV.3 para detectar el receptor FcγRIIB en la membrana de las células NIH3T3 (Figura 21).

Los histogramas demostraron que las transfecciones dan resultados similares ya que en las transfecciones 1, 2, 3 se ven dos poblaciones celulares una con el receptor y otras sin el receptor esto debido a que alcanzaron la confluencia en pocos días, por lo cual no se alcanzaron a seleccionar en cultivo totalmente. Sin embargo, estas células se dejaron en cultivo bajo la presión del antibiótico G418 para que se hicieran poblaciones homogéneas de células NIH3T3 que expresen el receptor FcγRIIB. En cuanto a la transfección número 4 se observa en el histograma que la mayoría de las células no expresan el receptor FcγRIIB, de igual forma se dejaron en cultivo bajo la presión del antibiótico G418, pero estas células se murieron por completo en cultivo.

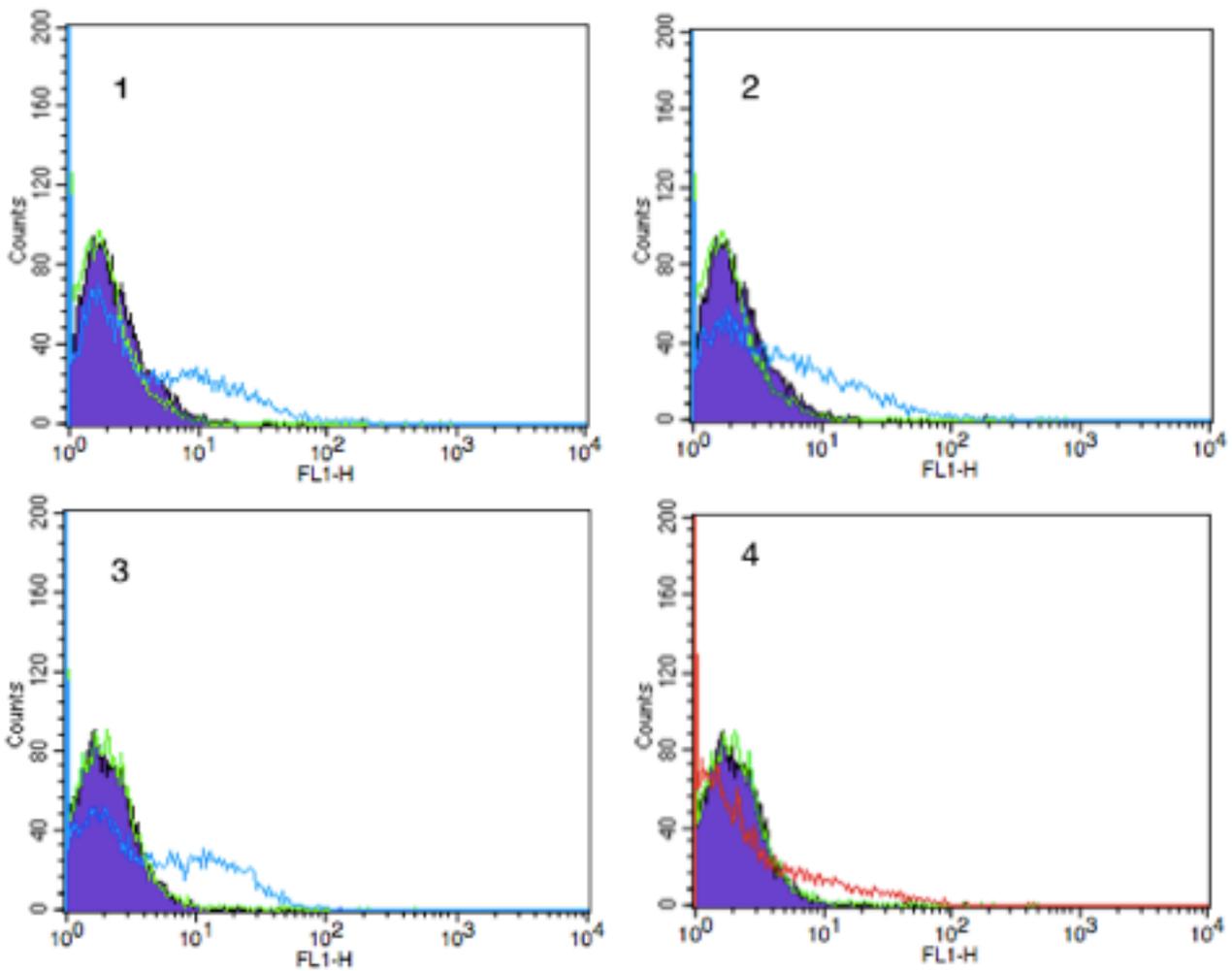


Figura 21.- Inmunofluorescencia para el receptor Fc γ RIIB en células NIH3T3 transfectadas, utilizando el anticuerpo IV.3 para detectarlo. En morado control de fluorescencia, en verde células sin transfectar con anticuerpo IV.3 y FITC y en azul y rojo células transfectadas con anticuerpo IV.3 y FITC. Se observa que la transfeccion número 4 prácticamente no tiene células que expresen el receptor. Sin embargo para las transfecciones 1, 2, y 3 si se observa una población de células con el receptor pero también se observan células sin el receptor, esto debido a que no se han seleccionado por completo estas células en cultivo.

Las células de las Transfecciones 1, 2 y 3 alcanzaron la confluencia después de un tiempo de selección con el antibiótico G418 y se expandieron a cajas T-25 para obtener un número mayor de células, una vez alcanzada la confluencia se les realizó nuevamente una tincion una inmunofluorescencia (Figura 22) para observar si realmente expresan el receptor Fc γ RIIB.

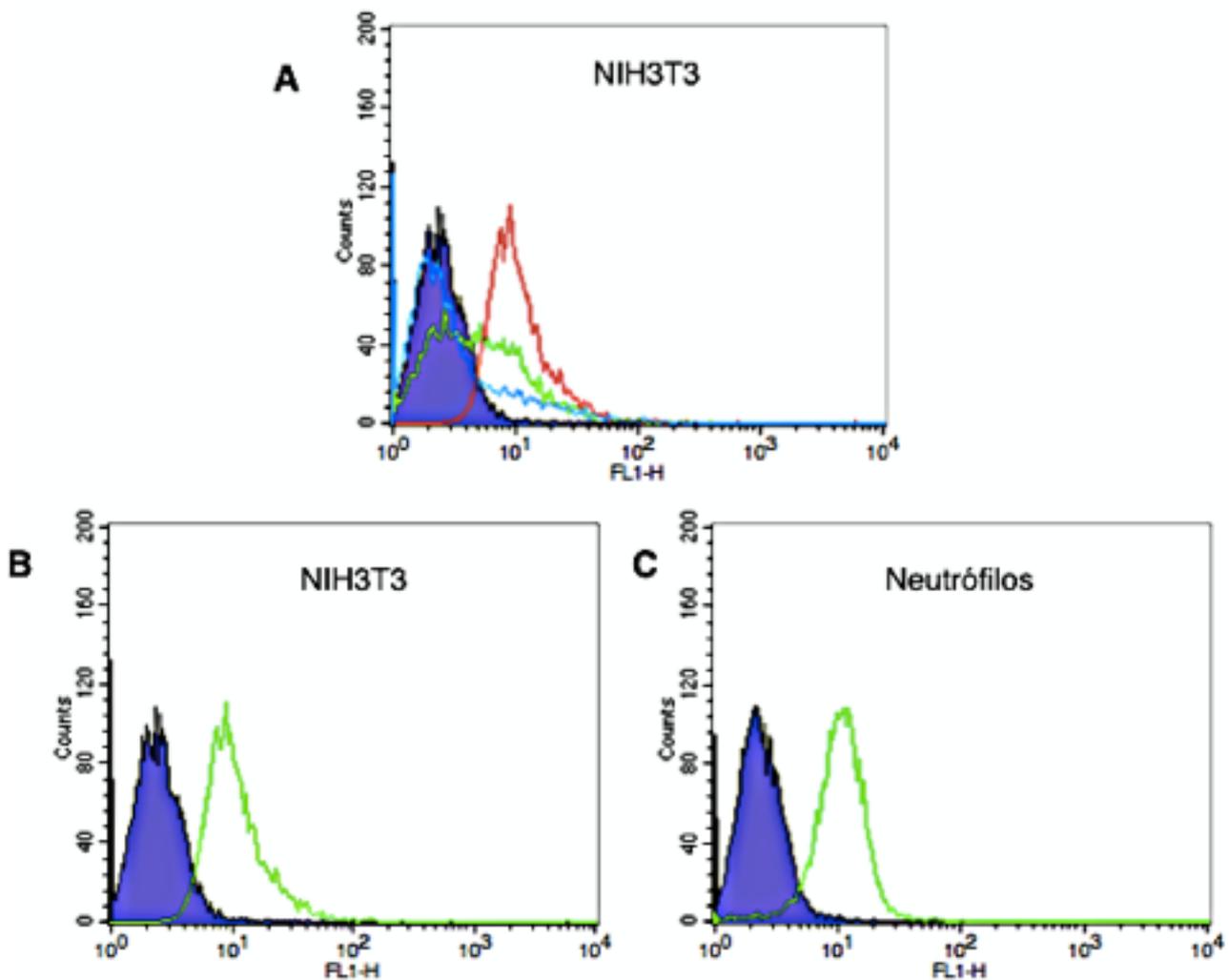


Figura 22.- Inmunofluorescencia para el receptor FcγRIIB en células NIH3T3 transfectadas y seleccionadas en cultivo con el antibiótico G418. A) En morado control de fluorescencia, en azul transfeccion 2, verde transfeccion 1 y rojo Transfeccion 3. Todas las células marcadas con anticuerpo IV.3 y FITC. B) En morado control de fluorescencia y en verde células de la transfeccion 3 marcadas con IV.3 y FITC, se observa que estas células expresan el receptor FcγRIIB y que el histograma es idéntico al control positivo con neutrófilos en C. C) control positivo con neutrófilos, en morado control de fluorescencia y en verde marcados con IV.3 y FITC.

Así mismo para ver que la técnica y anticuerpos funcionan se realizó un control positivo con neutrófilos utilizando el mismo anticuerpo IV.3 que detecta el receptor FcγRIIA que los neutrófilos expresan de forma natural. Los resultados demuestran que la selección de las células transfectadas con el antibiótico G418 realmente funciona, por lo que ahora se ven una mayor cantidad de células con la expresión del receptor FcγRIIB en el caso de la transfeccion numero 3 (figura 22 A).

para la transfeccion 3 se observa que todas las células expresan el receptor, sin embargo para la transfeccion 1 aún hay dos poblaciones de células unas con el receptor y otras sin el receptor y finalmente para la transfeccion 2 se puede ver que la mayoría de las células no expresan el receptor.

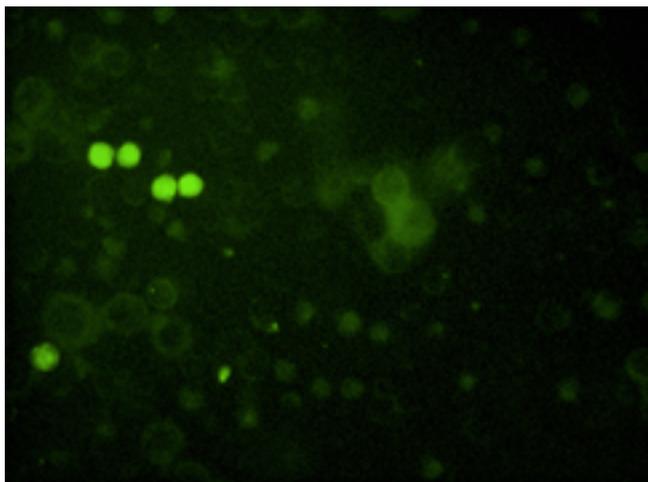
Por otro lado el control positivo con neutrófilos demuestra que los anticuerpos funcionan correctamente y muestran como se debería ver la población celular que expresan el receptor FcγRIIB, tal es el caso de la transfeccion 3 (Figura 22 B) que se ve idéntico al control positivo indicando que las células NIH3T3 de esta transfeccion expresan en sus membranas el receptor FcγRIIB, por lo que estas células se expandieron en cultivo bajo la presión del antibiótico G418 y se congelaron varios viales para preservarlas hasta el momento de utilizarlas.

Obtención de monocitos (THP-1) que expresen el receptor FcγRIIIB

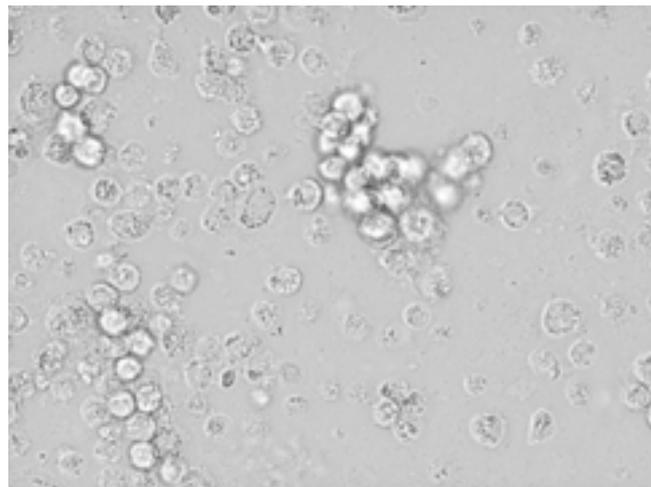
Transfección de células THP-1 (Monocitos) por Nucleofector con plásmido que contiene el cDNA que codifica para el receptor FcγRIIIB.

Para obtener THP-1 transfectadas con el receptor FcγRIIIB se procedió a estandarizar la técnica de transfección para estas células por el método de electroporación y el plásmido que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) .

Encontramos que con el programa Y-001 del nucleofector y 5 µg de plásmido se obtiene mayor cantidad de células positivas a la transfección (Figura 23)



Luz UV 20X



Luz visible 20X

Figura 23.- Transfección de células THP-1 por electroporación con las condiciones óptimas.

Después de comprobar que se pueden transfectar con buena eficiencia las células THP-1 se procedió a transfectarlas con el plásmido que contiene el cDNA que codifica para el receptor FcγRIIIB. Para esto se transformaron bacterias *E.coli* de la cepa DH5α con el plásmido cDNA FcγRIIIB para hacer cultivos saturados y posteriormente se purificó el DNA utilizando QIAfilter Plasmid Maxi Kits de QIAGEN.

Se utilizó el programa Y-001 del nucleofector y 5 µg del plásmido purificado, posterior a las 48 horas de la transfección se agregó medio RPMI suplementado más antibiótico G418 500 µg/ml para seleccionar a las células positivas. Alcanzada la confluencia se hizo una inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos 3G8 que reconoce al receptor FcγRIIIB 10 µg/ml y FITC (1:400).

Los resultados se analizaron en el citómetro de flujo.

Se realizaron 3 transfecciones diferentes y los resultados muestran que hay dos transfecciones que resultaron totalmente positivas, es decir que expresan el receptor FcγRIIIB en su membrana (azul y rosa) comparadas con las células sin transfectar (verde) (Figura 24), las células correspondientes a la transfección azul y rosa se expandieron en cultivo para tener un número suficiente y probar la funcionalidad del receptor FcγRIIIB en estas células.

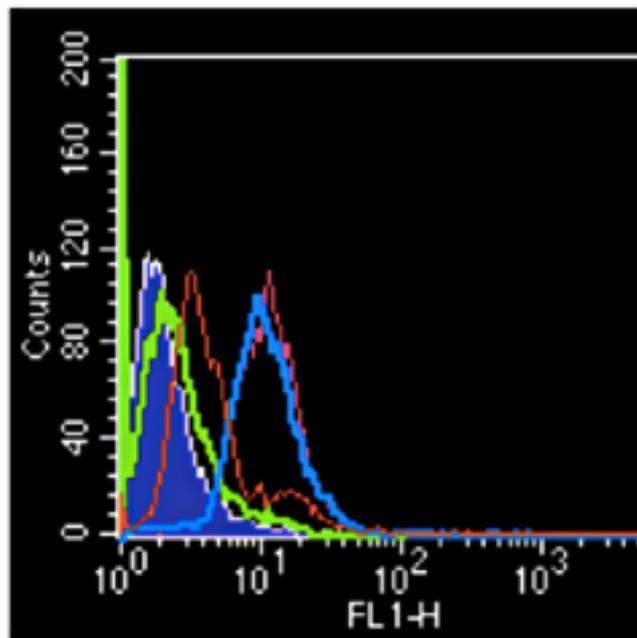


Figura 24.- Histograma de 3 transfecciones diferentes de células THP-1 con el receptor $Fc\gamma RIIIB$. En morado control de fluorescencia, en verde células THP-1 sin transfectar con el anticuerpo 3G8 y FITC. En azul, rosa y rojo células THP-1 transfectadas con el anticuerpo 3G8 y FITC. Se observa que dos transfecciones (Azul y Rosa) expresan claramente el receptor $Fc\gamma RIIIB$ y que la transfección en rojo también expresa el receptor pero no tan claramente como las dos anteriores comparadas con las células sin transfectar (en verde).

Después de 4 semanas de mantener en cultivo las células de las transfecciones azul y rosa se realizó otra tinción de inmunofluorescencia para corroborar que efectivamente las células expresaran el receptor $Fc\gamma RIIIB$ y que no perdieran la expresión. Esto para así estar seguros de experimentar con el receptor $Fc\gamma RIIIB$ en las células THP-1(Figura 25). Los resultados demuestran que las células THP-1 no perdieron la expresión del receptor $Fc\gamma RIIIB$ y que se mantiene a través del tiempo bajo la presión del antibiótico G418.

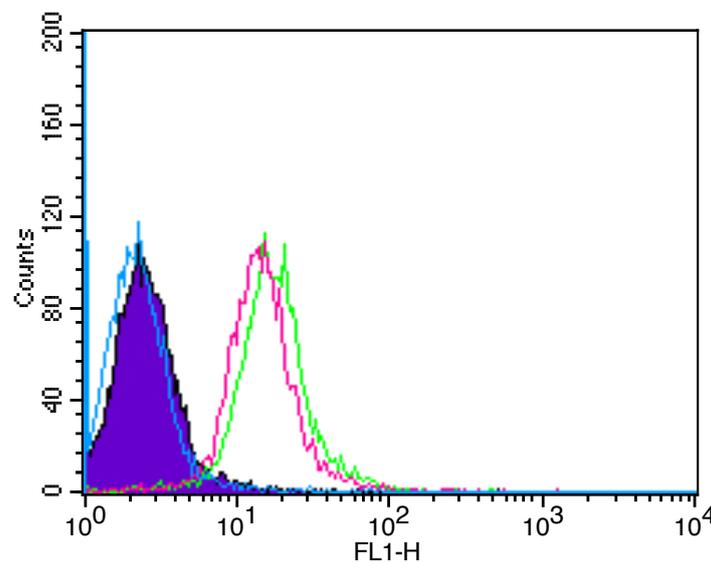


Figura 25.- Histograma de células THP-1 que expresan el receptor $Fc\gamma RIIIB$ después de 4 semanas en cultivo. En morado control de fluorescencia, en azul THP-1 sin transfectar con anticuerpo 3G8 y FITC, en rosa y verde THP-1 transfectadas con anticuerpo 3G8 y FITC. Se observa que estas células THP-1 no pierden la expresión a través del tiempo.

Funcionalidad del receptor FcγRIIIB en células THP-1

Para ver si las células THP-1 que expresan el receptor FcγRIIIB lo mantienen “funcional” y poder utilizar estas células para dilucidar la vía de señalización que desencadena este receptor. Se realizaron diferentes ensayos, como en los que se ha visto que participa el receptor FcγRIIIB en neutrófilos, tales como son: movilización de Ca²⁺ intracelular, se sabe que en neutrófilos este receptor moviliza Ca²⁺ intracelular; activación de la vía de las MAPKs por Western Blot, se a visto en neutrófilos que este receptor activa la vía de las MAPKs para promover de factores nucleares y medición de la activación de NF-κB utilizando FACS, en neutrófilos está descrito que el receptor FcγRIIIB activa NF-κB para accionar diversos factores de transcripción.

Movilización de Ca²⁺ intracelular estimulando el receptor FcγRIIIB en THP-1 transfectadas

Para medir la movilización de Ca²⁺ intracelular se colocaron 100 millones células en PBS 1X + 1.5 mM de Ca²⁺ y 1.5mM de Mg²⁺ y posteriormente se cargaron las células con Fura-2-AM a 10 μM. Posteriormente, se incubaron las células cargadas de Fura-2-AM con el anticuerpo 3G8 (que reconoce al receptor FcγRIIIB) a una concentración de 10 μg/mL para poder medir la movilización de Ca²⁺ intracelular estimulando este receptor. Las muestras se leyeron en un espectrofluorímetro. Para estimular el receptor se utilizó un entrecruzador F(ab')₂ goat anti-mouse IgG 60 μg/mL después de los 60 segundos del registro.

Se probaron los dos cultivos celulares que anteriormente se había visto que expresan el receptor FcγRIIIB (Figura 26).

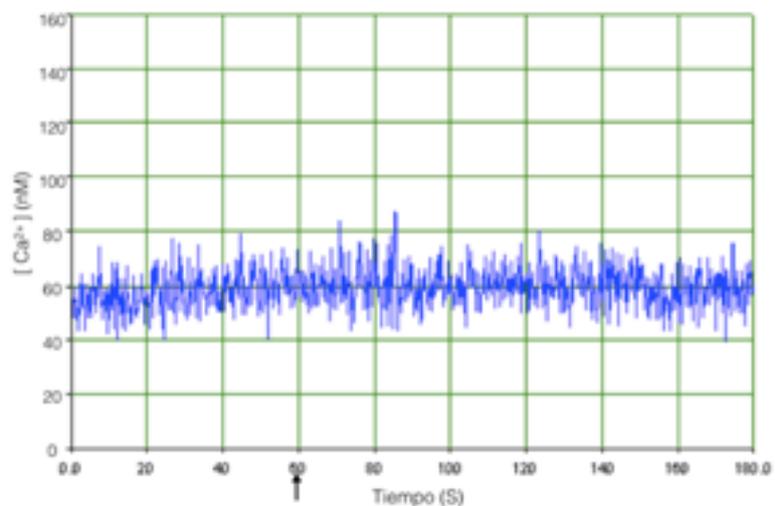
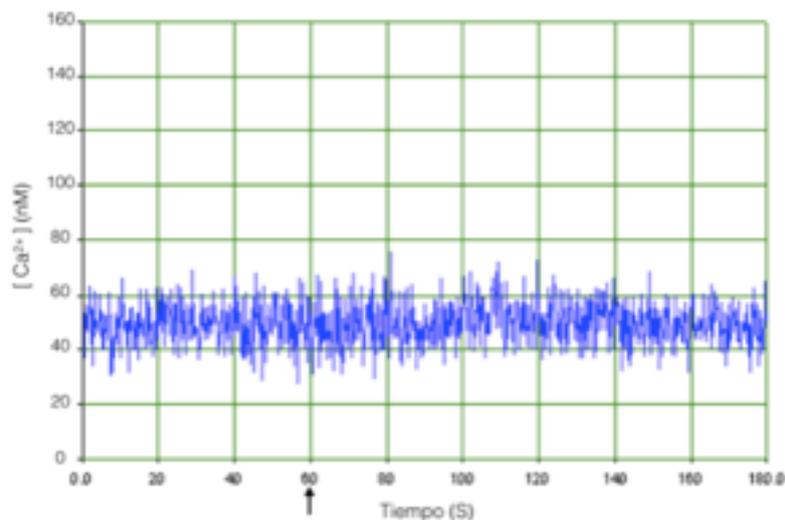


Figura 26.- Movilización de Ca^{2+} intracelular en células THP-1 estimulando el receptor $\text{Fc}\gamma\text{RIIIB}$. Las células THP-1 transfectadas con el receptor $\text{Fc}\gamma\text{RIIIB}$ se cargaron con Fura-2-AM para medir la movilización de Ca^{2+} intracelular al estimular el receptor. Como se observa en la figura no se detecta movilización de Ca^{2+} intracelular al estimular el receptor $\text{Fc}\gamma\text{RIIIB}$ con ninguna de los dos cultivos celulares que se había visto que expresaban el receptor $\text{Fc}\gamma\text{RIIIB}$, al dar el estímulo a los 60 segundos no se detecta ningún cambio en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular.

Como se observa en la figura 26, no se detectó movilización de Ca^{2+} intracelular estimulando el receptor $\text{Fc}\gamma\text{RIIIB}$ en células THP-1, lo que nos indica que tal vez este receptor no es funcional en estas células. Para confirmar que la técnica empleada fuera funcional o que las células THP-1 transfectadas con el receptor $\text{Fc}\gamma\text{RIIIB}$ funcionan y que por tanto no se observaba movilización de Ca^{2+} debido al receptor y no a que la célula no responde. Se repitieron estos experimentos con las mismas células pero ahora estimulando el receptor $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ utilizando el anticuerpo IV.3 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$; ya que se ha visto que este receptor también aumenta los niveles de calcio y las THP-1 lo expresan naturalmente.

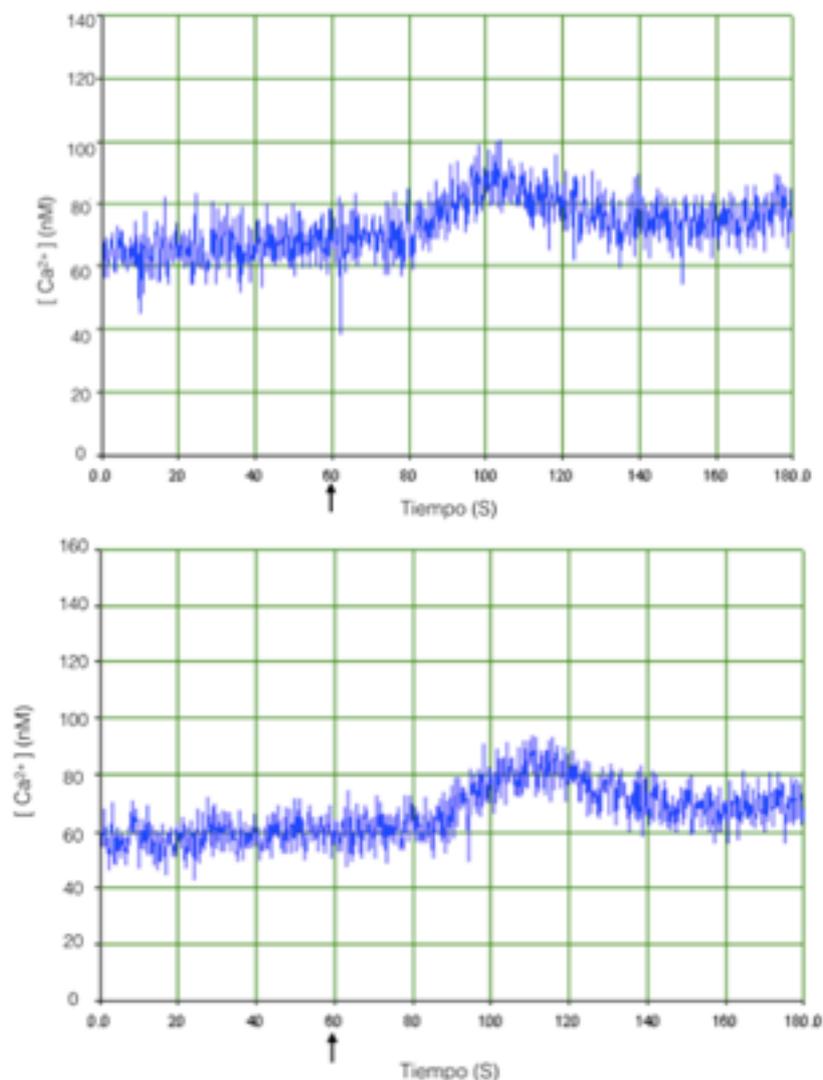


Figura 27.- Movilización de Ca^{2+} intracelular en células THP-1 estimulando el receptor $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$. Las células THP-1 transfectadas con el receptor $\text{Fc}\gamma\text{RIIIB}$ se cargaron con Fura-2-AM para medir la movilización de Ca^{2+} intracelular al estimular el receptor $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ que naturalmente es expresado en estas células. Se observa a los 60 segundos que se dio el estímulo un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular indicando que el receptor $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ en nuestras células transfectadas si responden para y que incrementan los niveles de Ca^{2+} intracelular.

Los resultados demuestran que estimulando el receptor FcγRIIA de las células THP-1 transfectadas si se ve movilización de Ca²⁺ intracelular (Figura 27), lo cual indica que las células son funcionales y que no se observa movilización de Ca²⁺ estimulando el receptor FcγRIIIB probablemente porque este receptor no es funcional en esta línea celular o que a estas células les falta la maquinaria necesaria para activar la vía de señalización que lleva a cabo el receptor FcγRIIIB para la movilización de Ca²⁺. Ya que como sabemos que este receptor se ancla a la célula de manera diferente a los demás.

Debido a que no se observó movilización de Ca²⁺ intracelular en las THP-1 transfectadas con el receptor FcγRIIIB, se analizó nuevamente la presencia de este receptor en las células THP-1 para verificar que aún lo expresen y descartar la posibilidad de que no se detectaba movilización de Ca²⁺ intracelular debido a la ausencia del receptor. Para esto se realizó otra inmunofluorescencia a las células THP-1 Transfectadas con el receptor FcγRIIIB utilizando el anticuerpo 3G8.

El análisis de estas células en el citómetro nos mostró que si expresan el receptor en su membrana (Figura 28), ya que en el histograma se observa que las células aún conservan la expresión del receptor FcγRIIIB.

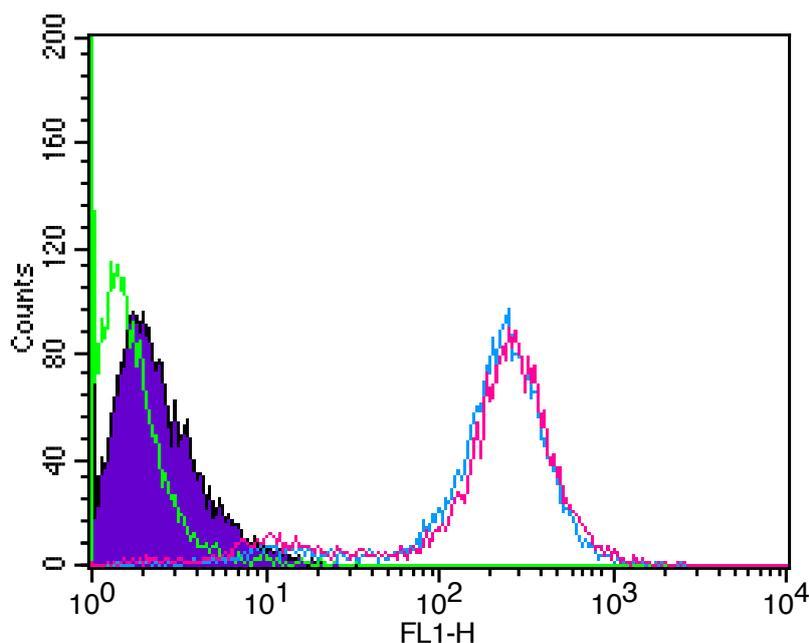


Figura 28.- Inmunofluorescencia del receptor FcγRIIIB en células THP-1. En morado control de fluorescencia, verde células THP-1 sin transfectar con 3G8+FITC, rosa y azul células THP-1 transfectadas con 3G8+FITC. Se observa que las células aún conservan la expresión del receptor.

Debido a que no comprobamos la funcionalidad del receptor FcγRIIIB en células THP-1 por movilización de Ca²⁺ intracelular utilizamos otro método para comprobar la funcionalidad del receptor.

Western Blot de células THP-1 transfectadas con FcγRIIIB para identificar pERK

Utilizamos Western blot para identificar pERK estimulando el receptor FcγRIIIB con anticuerpo 3G8, ya que se ha observado que en neutrófilos este receptor activa la vía de las MAPKs.

Para estimular las células y hacer el Western blot:

Se utilizó el anticuerpo primario 3G8 a una concentración de 10µg/mL durante 30 minutos posteriormente se entrecruzó con F(ab')₂ las muestras correspondientes durante 10 minutos. Una vez estimuladas las células, se lisaron con buffer RIPA más un coctel de inhibidores de proteasas.

Se recuperaron las proteínas y se sometieron a una electroforesis en un gel de acrilamida al 8%, después se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo primario correspondiente (Rabbit anti MAPK(ERK1) 1/1000 y Mouse monoclonal IgG anti p-ERK 1/1000) después de 3.5 horas se lavó la membrana con TBS-T para posteriormente incubarla con el anticuerpo secundario correspondiente (HRP F(ab)₂ goat anti Rabbit 1/3000 y HRP F(ab)₂ goat anti Mouse 1/3000). Finalmente se reveló la membrana utilizando Immobilon Western Chemiluminescent HRP sustrate.

Los resultados nos indicaron que estimulando el receptor FcγRIIIB con el anticuerpo 3G8 y entrecruzando con F(ab)₂ en las células THP-1 transfectadas, si observamos activación de la vía de las MAPKs ya que se pudo detectar la presencia de ERK fosforilado. Sin embargo, al poner las mismas células sin estímulo o solo con el anticuerpo 3G8 y sin entrecruzar no se detecta ERK fosforilado indicando que al entrecruzar el receptor FcγRIIIB en las THP-1 hay una respuesta celular que lleva a la activación de la vía de las MAPKs, lo cual demuestra que el receptor en estas células además de estar expresado es funcional (Figura 29).

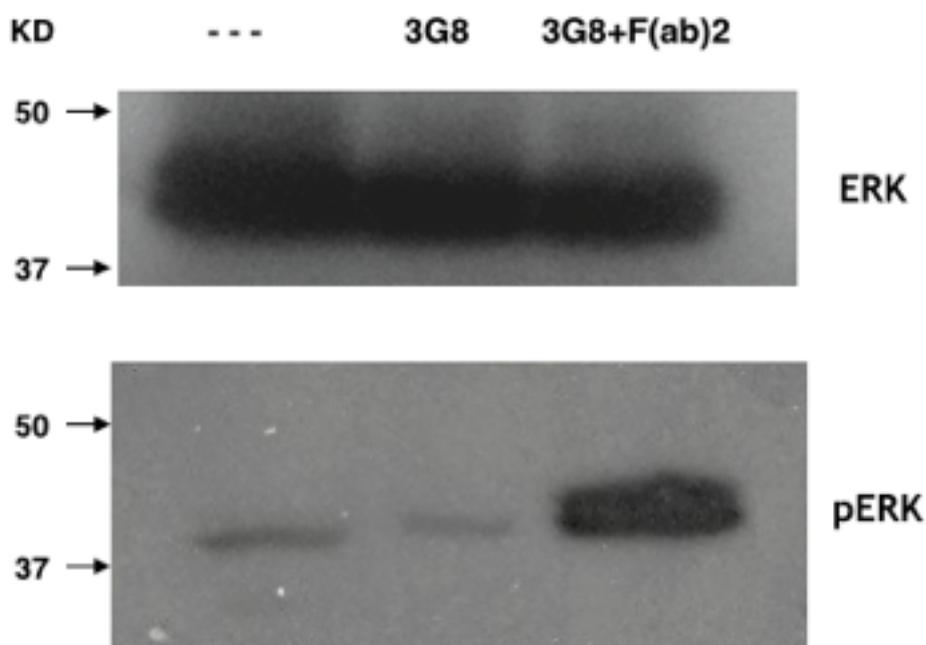


Figura 29.- Western blot de células THP-1 transfectadas con el receptor FcγRIIIB para identificar ERK total (control de carga) y pERK. Como se observa en la figura, estimulando las células THP-1 con el anticuerpo 3G8 (que identifica específicamente al receptor FcγRIIIB) y entrecruzándolo con F(ab)2 se activa la vía de las MAPKs indicando la funcionalidad del receptor FcγRIIIB en las células THP-1.

Para corroborar estos resultados se repitió el experimento, pero ahora utilizando un control positivo. Se utilizó como control positivo el receptor FcγRIIA (presente de forma natural en las THP-1) ya que se ha visto que también activa la vía de las MAPKs al ser estimulado, para esto se estimularon las mismas células THP-1 transfectadas con el anticuerpo IV.3 y se entrecruzó de la misma forma que con el receptor FcγRIIIB.

Los resultados fueron los mismos que en el experimento pasado ya que se observa ERK fosforilado al estimular y entrecruzar el receptor FcγRIIIB en las THP-1, así mismo se observa que estimulando y entrecruzando el receptor FcγRIIA en estas células se activa la vía de las MPKs ya que se detecta ERK fosforilado. Además comparando la respuesta de estos dos receptores en las mismas células, se puede observar que el receptor FcγRIIIB da una señal mayor indicando que este receptor es más efectivo en la activación la vía de las MAPKs (Figura 30). Los resultados refuerzan el hecho de la funcionalidad del receptor FcγRIIIB en las células THP-1.

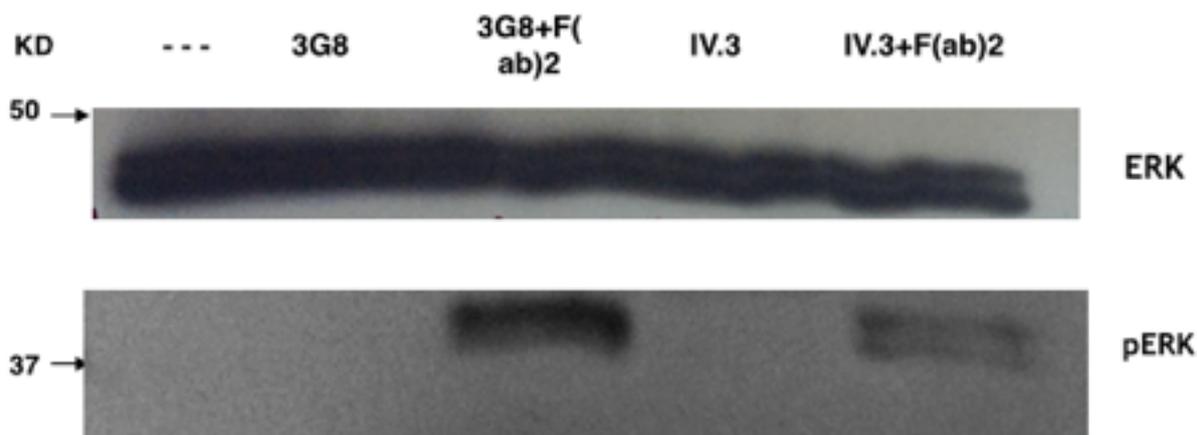


Figura 30.- Western blot de células THP-1 estimulando el receptor FcγRIIIB y FcγRIIA para identificar ERK total (control de carga) y ERK fosforilado. Los resultados indican que el estímulo y entrecruzamiento de ambos receptores activa la vía de las MAPKs en las células THP-1 transferidas, así mismo se ve una mayor señal con el receptor FcγRIIIB que con el FcγRIIA comprobando que el receptor FcγRIIIB es funcional en estas células.

Finalmente para asegurar que la activación de la vida de las MAPKs se debe a la activación del receptor FcγRIIIB en las THP-1 y no solo a el entrecruzamiento por si solo, se realizó un Western blot con un tratamiento igual tanto a células THP-1 sin transfectar como a las células THP-1 transfectadas con el receptor FcγRIIIB. Estimulando en ambos casos con el anticuerpo 3G8 y entrecruzador.

Con estos resultados compruebo la funcionalidad del receptor FcγRIIIB en las células THP-1 ya que al activarlo se activa la vía de las MAPKs como anteriormente se había demostrado y en el caso de las células THP-1 sin transfectar no se activa la vía de las MAPKs debido a que el receptor FcγRIIIB no se encuentra en estas células, asegurándonos que el receptor FcγRIIIB es funcional en estas células (Figura 31).

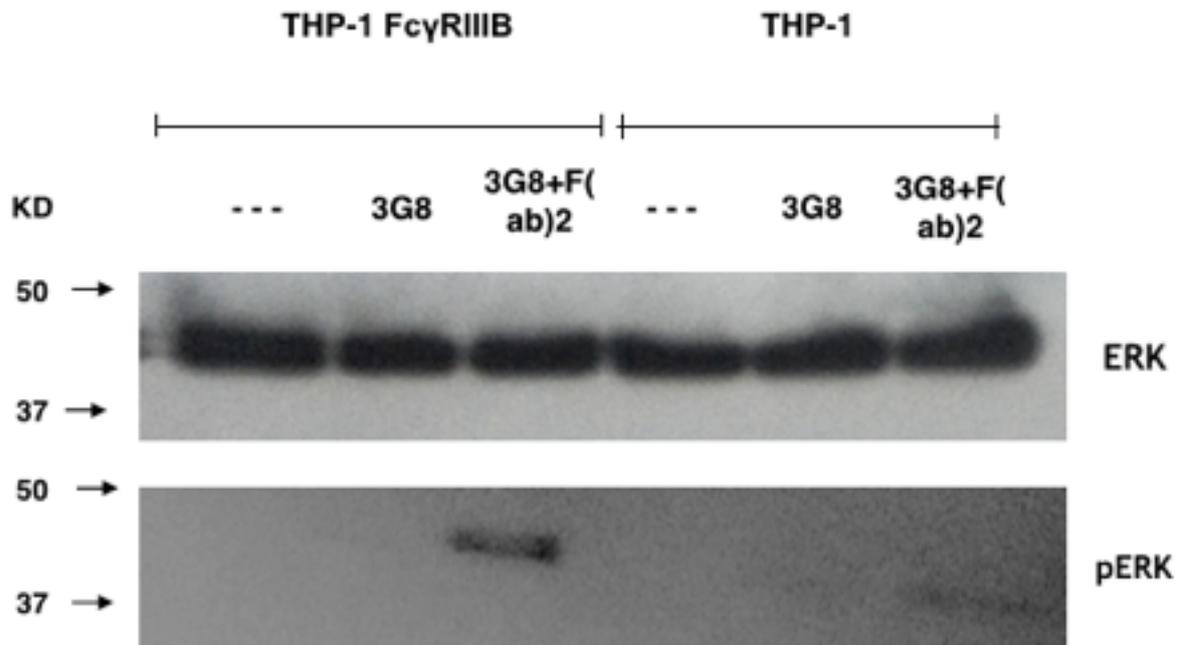


Figura 31.- Western Blot de células THP-1 transfectadas y células THP-1 sin transfectar para detectar pERK estimulando el receptor FcγRIIIB. Se observa que únicamente con las células transfectadas se activa la vía de las MPKs indicando que el receptor se estimula de la forma adecuada y que es funcional en las células THP-1.

Estimulación del receptor FcγRIIIB en THP-1 para medir activación de NF-κB utilizando FACS

Para ver si el receptor FcγRIIIB además de activar la vía de las MAPKs también activa NF-κB tal como sucede en neutrófilos. Estimulamos el receptor de FcγRIIIB en las THP-1 para medir la fosforilación de NF-κB por citometría de flujo. En neutrófilos se ha visto que al estimular el receptor FcγRIIIB y entrecruzarlo es capaz de inducir activación de NF-κB independientemente de la asociación con cualquier otro receptor, es por eso que medimos la activación de NF-κB en células THP-1 transfectadas con el receptor FcγRIIIB.

Para medir la activación de NF-κB: Se estimuló el receptor FcγRIIIB usando el anticuerpo 3G8 a 10 µg/mL y se entrecruzó con F(ab)2 60 µg/mL. Posteriormente a esto se extrajeron los núcleos y se les realizó una inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti- p50 (2.5 µg/mL). Los resultados nos sugiere que el estímulo y entrecruzamiento del receptor FcγRIIIB en las células THP-1 efectivamente activa NF-κB ya que se detectó un incremento de p50 fosforilado en núcleo (Figura 32) comparándolo con el p50 basal.

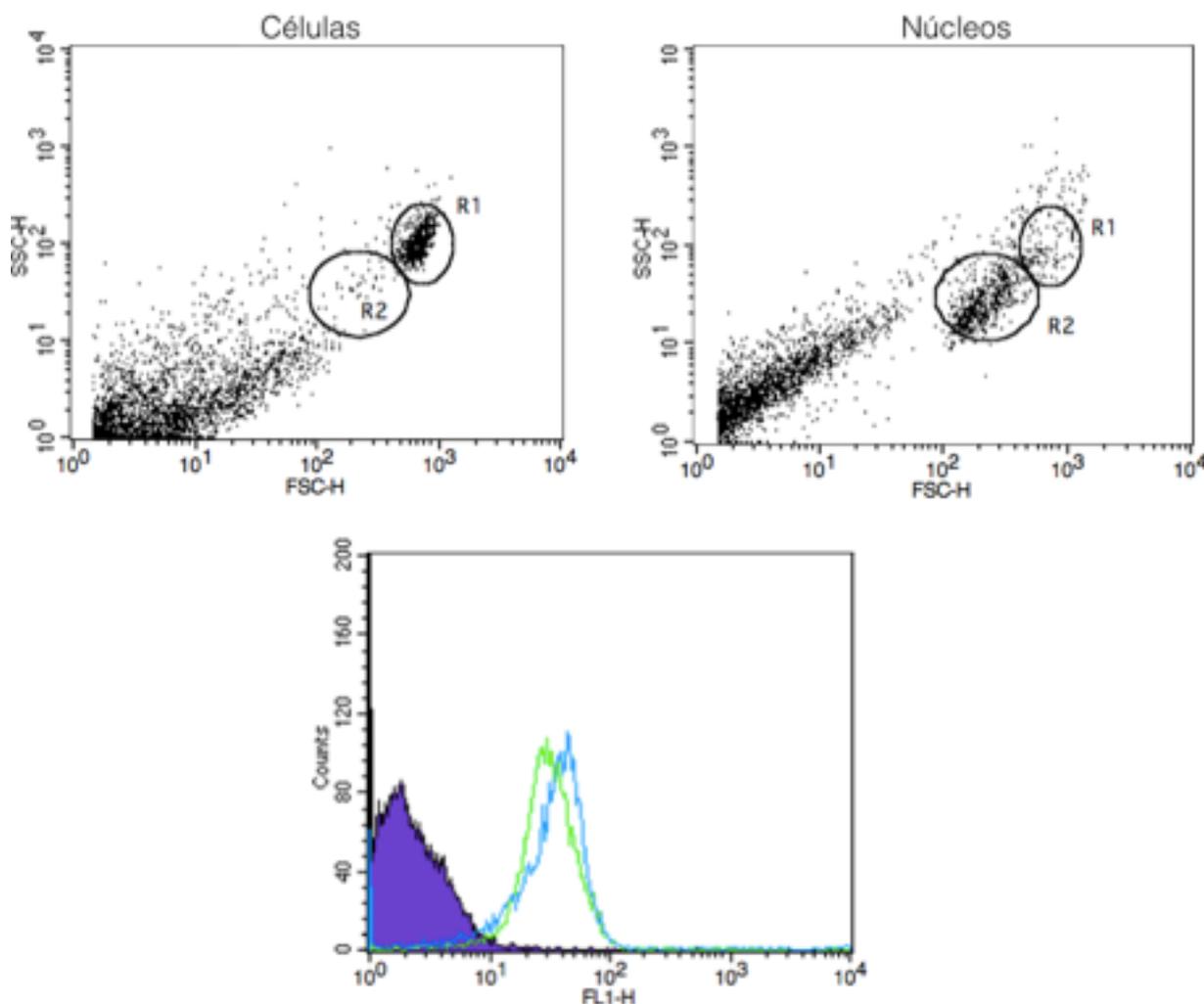


Figura 32 .- Análisis de citometría de flujo para medir activación de NF-κB estimulando el receptor FcγRIIIB en células THP-1. Se observan en las gráficas de puntos células (R1) y núcleos (R2) separados y en el histograma control de fluorescencia de núcleos (morado) p50 basal (verde) y p50 fosforilado (azul). Se alcanza a detectar un incremento de p50 fosforilado en el núcleo de las células indicando que la activación y entrecruzamiento del receptor FcγRIIIB activa NF-κB en las células THP-1.

Con estos resultados se asegura que las células THP-1 transfectadas con el receptor FcγRIIIB además de expresarlo, lo mantienen funcional y que se comporta de forma parecida que en neutrófilos. Sin embargo, debido a que no observamos movilización de calcio intracelular, nos lleva a pensar que les falta alguna molécula a estas células que no permite realizar esta acción. En contraste, este es un camino interesante a seguir en futuros proyectos, además de que con estas células se podrá dilucidar la vía de señalización que desencadena el receptor FcγRIIIB en la respuesta inmune.

Discusión

Los Fc γ R están expresados en una variedad de células del sistema inmune incluyendo monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas, mastocitos, células B y T, basófilos y células NK. En estas células desencadenan diferentes vías de señalización para diferentes funciones como la fagocitosis, degranulación y generación de citocinas proinflamatorias. Es por esto que estudiar la respuesta de cada Fc γ R por separado a través de su vía de señalización resulta de gran utilidad para comprender el papel de los receptores Fc en la respuesta inmune (1,4).

Por otro lado con las técnicas de transfección celular podemos expresar una molécula deseada en una célula que naturalmente no la expresa, lo que nos permite estudiar entre otras cosas, el comportamiento de la molécula en cuestión en otros tipos celulares, analizar la molécula deseada cuando naturalmente es difícil por el tipo de célula al que pertenece y dilucidar de una forma más fácil el papel de la molécula en la respuesta celular. En este trabajo utilizamos la técnica de transfección para expresar los receptores Fc γ RIIA y Fc γ RIIB de humano en fibroblastos de ratón (NIH3T3) y el receptor Fc γ RIIB en monocitos humanos (THP-1).

Utilizamos dos técnicas de transfección; una fue con lipofectamina 2000 y la otra técnica utilizada fue la electroporación con Nucleofector. Para observar qué técnica resultaba más eficiente utilizamos un plásmido con GFP. Nosotros observamos que la técnica de electroporación con Nucleofector es más eficiente, ya que con esta técnica obtuvimos mayor cantidad de células positivas al momento del experimento, así mismo observamos que a las 48 horas hay mayor número de células positivas; momento en el cual es posible seleccionar las células mediante el uso del antibiótico geneticina (G418) para obtener una población homogénea de células con expresión positiva del receptor deseado.

De igual forma si comparamos nuestro método de transfección con otro trabajo (73), por ejemplo, donde usan el reactivo MegaTran 1.0, nosotros con nucleofector obtenemos 50% de células positivas, mientras que con MegaTran 1.0 obtienen 40% de células positivas a las 48 horas después de la transfección.

Con la técnica de transfección por electroporación obtuvimos fibroblastos de origen murino que expresan el receptor Fc γ RIIA ó Fc γ RIIB y células THP-1 que expresan el receptor Fc γ RIIB. En los tres casos se determinó la expresión de los receptores por citometría de flujo.

Células THP-1 transfectados con el receptor Fc γ RIIB, se analizaron por citometría de flujo para evaluar la expresión del receptor con el paso del tiempo. Los resultados demuestran que no pierden la expresión, contrariamente; se observa un aumento en la expresión del receptor, tal como lo indican otros autores (74) incluso después de ser congelados y descongelados, por lo cual se puede experimentar de forma confiable con el receptor Fc γ RIIB en estas células.

Cabe recordar que el receptor Fc γ RIIB es exclusivo de los neutrófilos, los cuales son células que se obtienen después de ser purificados de la sangre con métodos que implican procedimientos largos (6) además son células de vida corta, por lo cual experimentar con neutrófilos para dilucidar la vía

de señalización del receptor FcγRIIIB se torna complicado. En contraste, el obtener las células THP-1 transfectadas con el receptor FcγRIIIB resulta de mucha ayuda para dilucidar la vía de señalización de dicho receptor sin necesidad de extraer neutrófilos de sangre.

En nuestro laboratorio se habían podido obtener células HL-60 y K-542 que expresan el receptor FcγRIIIB de forma artificial (75), pero no se había podido demostrar que el receptor FcγRIIIB fuera funcional en dichas células. Para demostrar que además de mantener la expresión del receptor FcγRIIIB, las células THP-1 lo mantienen funcional, se probaron tres métodos diferentes con los cuales se ha observado la participación de este receptor en neutrófilos (6, 7, 40). Tales como son: movilización de Ca²⁺ intracelular, activación de la vía de las MAPKs por Western Blot y medición de la activación de NF-κB utilizando FACS.

Con los ensayos de movilización de Ca²⁺ intracelular no demostramos la funcionalidad del receptor, debido a que no se detectó movilización de Ca²⁺ intracelular en las células THP-1 transfectadas con el receptor FcγRIIIB estimulando dicho receptor. Sin embargo, al estimular el receptor FcγRIIA en estas mismas células, si se detectó movilización de Ca²⁺ intracelular, demostrando que las THP-1 transfectadas responden al estímulo, pero el receptor FcγRIIIB no moviliza Ca²⁺ intracelular en estas células.

Estos resultados contradicen lo que otros autores proponen, ya que se menciona que en neutrófilos tanto el receptor FcγRIIIB como el FcγRIIA inducen movilización de Ca²⁺ intracelular (11). Lo que nosotros observamos podría deberse a que el mecanismo de anclaje del receptor FcγRIIIB es diferente a los demás FcγR y por ende los monocitos no cuentan con la maquinaria para realizar la movilización de Ca²⁺ intracelular estimulando el receptor FcγRIIIB. Estos resultados refuerza la idea de algunos autores (11, 42), que proponen que el receptor FcγRIIIB induce la movilización de Ca²⁺ intracelular de forma independiente del receptor FcγRIIA y además refuerza la idea de que estos dos receptores actúan por vías distintas.

Debido a que con la movilización de Ca²⁺ intracelular no pudimos demostrar la funcionalidad del receptor FcγRIIIB en las células THP-1, experimentamos con las células THP-1 transfectadas para detectar pERK estimulando el receptor FcγRIIIB. Los resultados demuestran que al estimular el receptor FcγRIIIB en las THP-1, si se activa la vía de las MAPKs por ende se identifica pERK con Western Blot tal como lo indica la literatura en neutrófilos (6), comprobando la funcionalidad del receptor FcγRIIIB en las células THP-1 transfectadas. En contraste en las células THP-1 sin transfectar no se activó la vía de las MAPKs debido a que el receptor FcγRIIIB no se encuentra en estas células, asegurándonos que el receptor FcγRIIIB es funcional en las células transfectadas.

El análisis con citometría de flujo de la activación de NF-κB estimulando el receptor FcγRIIIB en las células THP-1 nos sugiere que el estímulo y entrecruzamiento del receptor FcγRIIIB en las células THP-1 efectivamente activa NF-κB ya que se detectó un incremento de p50 fosforilado en núcleo comparándolo con el p50 basal. Los resultados son similares a los encontrados en neutrofilos (7), reforzando la funcionalidad del receptor FcγRIIIB en las células THP-1 transfectadas.

Con estos resultados demuestro que las células THP-1 transfectadas con el receptor FcγRIIIB además de expresarlo, es funcional y se comporta de forma similar que en neutrófilos, a reserva de la movilización de Ca²⁺ intracelular. Sin embargo, este hecho despierta el interés para futuros experimentos en donde se puedan explicar de forma clara como es que señala este receptor, además de si es necesaria la participación del receptor FcγRIIA para la funcionalidad del FcγRIIIB como lo indican algunos autores y por ende el papel del receptor FcγRIIIB en la respuesta inmune.

Conclusiones

La técnica de transfección por electroporación con nucleofector resultó más eficiente comparándola con la transfección con lipofectamina 2000, ya que con la electroporación obtuvimos un mayor número de células positivas; con lo cual pudimos seleccionar las células en cultivo para obtener una población homogénea de células THP-1 que expresan el receptor FcγRIIIB y fibroblastos de ratón que expresan el receptor FcγRIIA ó FcγRIIB según sea el caso.

Las células positivas a la transfección no pierden la expresión del receptor a través del tiempo y bajo la presencia del antibiótico G418 que las esté seleccionando. Incluso se observa un aumento en la expresión del receptor con el paso del tiempo.

Anteriormente se había podido expresar el receptor FcγRIIIB artificialmente en otras células que no sean neutrófilos, sin embargo esta es la primera vez que se observa que el receptor además de expresarse en monocitos, es funcional.

Es interesante que al estimular el receptor FcγRIIIB en las células THP-1 no se detecte movilización de Ca²⁺ intracelular y que al estimular el receptor FcγRIIA si se observe movilización de Ca²⁺ intracelular, ya que en la literatura se dice que tanto FcγRIIIB como FcγRIIA inducen movilización de Ca²⁺ intracelular. Este hecho da pie a futuros experimentos.

El hecho de tener células THP-1 que expresen el receptor FcγRIIIB y que sea funcional resulta de gran utilidad para poder dilucidar la vía de señalización de este receptor ya que permanece indefinida.

Referencias

- 1.- Mora, N. Rosales, C. Funciones de los receptores Fc en mecanismos de defensa y regulación inmunitaria. *Rev Invest Clin* 2009; 61(4): 313-326.
- 2.- Thomas J. Richard A. Barbara A. Inmunología de Kuby. 2007. Mc Graw-Hill Interamericana. México, D. F. ISBN 13: 978-970-10-6454-2.
- 3.- Murphy, K. Travers, P. Walport, M. 2009. INMUNOLOGÍA DE JANEWAY. McGrawHill Séptima edición. ISBN 13:978-970-10-7347-6.
- 4.- Rosales, C. Uribe, E. Fc receptors: Cell activators of antibody functions. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2013. 4; 21-33
- 5.- Rosales C. Fc receptor and integrin signaling in phagocytes. *Signal Transduction* 2007;7: 386-401.
- 6.- Garcia, E. Nieto, G. Ruiz, M. Mora, N. Rosales, C. FcγRIIA and FcγRIIIB Mediate Nuclear Factor Activation through Separate Signaling Pathways in Human Neutrophils. *J. Immunol.* 2009; 182: 4547-4556.
- 7.- García, E. Rosales, C. Nuclear factor activation by FcγR in human peripheral blood neutrophils detected by a novel flow cytometry-based method. *Journal of Immunological Methods*. 2007. 320 104–118
- 8.- Tak W. Mak and Mary E. Saunders. 2006. *The Immune Response Basic and Clinical Principles*. ELSEVIER. ISBN 13: 978-0-12-088451-3
- 9.- Abbas, A. Lichtman, A. 2004. *Inmunología celular y molecular*. ELSEVIER. 5 ed. ISBN: 0-7216-00088-5.
- 10.- Vidarsson, G. Dekkers, G and Rispens, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology*. 2014. 520 1-17
- 11.- Jeffrey, C. Edberg, J. Moon, D. Chang and Kimberly R. Differential regulation of human Neutrophil FcγRIIa (CD32) and FcγRIIb (CD16) induced Ca²⁺ transients. *The Journals of Biological Chemistry*. 1998, 273:8071-8079.
- 12.- Nimmerjahn, F and Ravetch, J. Fc-receptors as regulators of immunity. *Advances in Immunology*. Chapter 5. Elsevier Inc. 2007. ISSN 0065-2776.
- 13.- Leclerc, J., Plater, C. and Fridman, W. (1977) The role of the Fc receptor (FcR) of thymus-derived lymphocytes. I. Presence of FcR on cytotoxic lymphocytes and absence of direct role in cytotoxicity. *European Journal of Immunology*, 7, 543-548.
- 14.- Rajendran, L. and Simons, K. Lipid rafts and membrane dynamics. *Journal of Cell Science*. 2005. 118, 1099-1102.

- 15.- Ravetch, J. and Bolland, S. IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 2001. 19:275–90
- 16.- Nimmerjahn, F and Ravetch, J. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature.* 2008. 8:34-47.
- 17.- Salcedo TW, Kurosaki T, Kanakara J. P, Ravetch JV, Perussia B. Physical and functional association of p56lck with Fc gamma RIIIA (CD16) in natural killer cells. 1993. *J. Exp. Med.* 177:1475–80.
- 18.- Regnault, A. Lankar, D. Lacabanne, V. Rodriguez, A. Rescigno, C. Saito, T. Bonnerot,* V. Castagnoli, P and Amigorena, S. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I–restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 189, 371–380 (1999).
- 19.- Varma, R and Mayor, S. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. 1998. *Nature* 394, 798-801
- 20.- Bertrand, G. Duprat, E. Lefranc, M. Marti, J. Coste, J. Characterization of human FCGR3B*02 (HNA-1b, NA2) cDNAs and IMGT standardized description of FCGR3B alleles. *Tissue Antigens.* 2004. Aug;64(2):119-31.
- 21.- Daëron, M. Latour, S. Malbec, O. Espinosa, E. Pina, P. Pasmans, S. and Fridman, W.H. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of FcγRIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. 1995. *Immunity*, 3, 635-646.
- 22.- Kono, H. Kyogoku, C. Suzuki, T. Tsuchiya, N. Honda, H. Yamamoto, K. Tokunaga, K. and Honda, Z. FcγRIIB Ile232Thr transmembrane polymorphism associated with human systemic lupus erythematosus decreases affinity to lipid rafts and attenuates inhibitory effects on B cell receptor signaling. *Human Molecular Genetics.* 2005. 14, 19. 2881–2892.
- 23.- Ono, M. Bolland, S. Tempst, P. and Ravetch, J.V. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc gamma RIIB. 1996. *Nature*, 383, 263–266.
- 24.- Daëron, M. and Lesourne, R. Negative signaling in Fc receptor complexes. 2006. *Advances in Immunology*, 89, 39-86.
- 25.- Horton, H. Chu, S. Ortiz, E. Pong, E. Cemerski, S. Leung, I. Jacob, N. Zalevsky, J. Desjarlais, J. Stohl, W and Szymkowski, D. Antibody-Mediated Coengagement of FcγRIIb and B Cell Receptor Complex Suppresses Humoral Immunity in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology.* 2011, 186: 000–000.
- 26.- McGaha, T. Sorrentino, B. Ravetch, J. Restoration of tolerance in lupus by targeted inhibitory receptor expression. *Science.* 2005. 307;590-594.
- 27.- Summers, C. Rankin, S and Chilvers, E. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 2010; 31(8):318-324.

- 28.- Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010. 33;657-671.
- 29.- Kobayashi, S. Voyich, J. Burlak, C and DeLeo, F. Neutrophils in the innate immune response. 2005. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*; 53(6):505-17.
- 30.- McCracken, J and Allen, L. Regulation of Human Neutrophil Apoptosis and Lifespan in Health and Disease. *Journal of Cell Death* 2014;7; 15-23.
- 31.- Klaus, M. Smith, E and Stark, M. IL-17A- producing neutrophil- regulatory Tn lymphocytes. *Immunologic Research*. 2006. 34;229-242.
- 32.- Nauseef, W. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev*. 2007;219:88–102.
- 33.- Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. 2006. *NATURE*. 6; 173-182.
- 34.- Futosi, K. Fodor, S. Mócsai, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. 2013. *International Immunopharmacology* 17; 638–650
- 35.-Hayashi, F. Means, T and Luster, A. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. 2003. *BLOOD*. 102; 7. 2660-2670.
- 36.-Capannolo, M. Fasciani, I. Romeo, S. Aloisi, G. Rossi, M. Bellio, P. Celenza, G. Cinque, B. Cifone, M. Scarselli, M and Maggio, R. The atypical antipsychotic clozapine selectively inhibits interleukin 8 (IL-8)-induced neutrophil chemotaxis. 2014. *Eur Neuropsychopharmacol*. 10.1016.
- 37.- Marois, L. Pare', G. Vaillancourt, M. Rollet-Labelle, E and Naccache, P. FcRIIIb Triggers Raft-dependent Calcium Influx in IgG-mediated Responses in Human Neutrophils. 2010. *The journal of biological chemistry*. 286, 5; 3509–3519.
- 38.- Coxon, A. Cullere, X. Knight, S. Sethi, S. Wakelin, M. Stavrakis, G. Luscinskas, F and Mayadas, T. FcRIII Mediates Neutrophil Recruitment to Immune Complexes: A Mechanism for Neutrophil Accumulation in Immune-Mediated Inflammation. 2001. *Immunity*. 14; 693-704.
- 39.- Newbrough SA, Mócsai A, Clemens RA, Wu JN, Silverman MA, Singer AL, et al. SLP-76 regulates Fcγ receptor and integrin signaling in neutrophils. *Immunity* 2003;19:761–9.
- 40.- Rivas, S. García, E. Nieto, G. and Rosales, C. Fc receptors exhibit different phagocytosis potential in human neutrophils. 2010. *Cellular Immunology*. 263; 114–121
- 41.- Edberg, J. Moon, J. Chang, D and Kimberly, R. Differential Regulation of Human Neutrophil FcγRIIa (CD32) and FcγRIIIb (CD16)-induced Ca²⁺ Transients. 1998. *The journal of biological chemistry*. 273; 8071-8079.
- 42.- Rosales, C and Brown, E. Signal transduction by neutrophil immunoglobulin G Fc receptors. Dissociation of intracytoplasmic calcium concentration rise from inositol 1,4,5-trisphosphate. 1992. *journal of biological chemistry*. 267; 5265-5271.

- 43.- Green, D. Death and NF-kappaB in T cell activation: life at the edge. 2003. *Mol. Cell* 11, 551-2.
- 44.- García, E and Rosales, C. Nuclear factor activation by FcγR in human peripheral blood neutrophils detected by a novel flow cytometry-based method. 2007. *Journal of Immunological Methods* 320; 104–118.
- 45.- García, E. Nieto, G. Ruiz, M. Mora, N and Rosales, C. FcRIIA and FcRIIIB Mediate Nuclear Factor Activation through Separate Signaling Pathways in Human Neutrophils. 2009. *The Journal of Immunology*. 182: 4547–4556.
- 46.- Nelson, D and Cox, M. LEHNINGER Principles of biochemistry. EUA. 2008. Fifth edition. ISBN-13: 978-0-7167-7108-1.
- 47.- Chang, L and Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. 2001. *Nature* 410: 37-40.
- 48.- Cargnello, M and Roux, P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. 2011. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 50-83.
- 49.- Maosong, Qi and Elaine, A. MAP kinase pathways. 2005. *Journal of Cell Science* 118, 3569-3572.
- 50.- Schaeffer, H and Weber, M. Mitogen-Activated Protein Kinases: Specific Messages from Ubiquitous Messengers. 1999. *Molecular and Cellular Biology*. 19; 2435-2444.
- 51.- Dong, C. Davis, R and Flavell, R. MAP KINASES IN THE IMMUNE RESPONSE. 2002. *Annu. Rev. Immunol.* 20:55–72.
- 52.- Boutros, T. Chevet, E and Metrakos, P. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase/MAP Kinase Phosphatase Regulation: Roles in Cell Growth, Death, and Cancer. 2008. 60; 261-310.
- 53.- Raman, M. Chen, W and Cobb, M. Differential regulation and properties of MAPKs. 2007. *Oncogene*. 26; 3100–3112.
- 55.- Turjanski, A. Vaqué, J and Gutkind, J. MAP kinases and the control of nuclear events. 2007. *Oncogene*. 26, 3240–3253
- 55.- Huang, G. Shi, L and Chi, H. Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination. 2009. 48(3): 161–169
- 56.- Kyriakis, J and Avruch, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. 2001. *Physiol Rev*. 81; 807–869.
- 57.- Alberts, Bruce. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K and Walter, P. *Molecular Biology of the cell*. Garland Science. 5 ed. United States of America. 2008. ISBN 978-0-8153-4105-5.

- 58.- Hayden, M and Ghosh, S. Signaling to NF- κ B. 2004. GENES & DEVELOPMENT 18:2195–2224.
- 59.- Perkins, N. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. Nature. 2007. 8; 49- 62.
- 60.- Pahl, H. L. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. 1999. Oncogene 18, 6853–6866.
- 61.- Li, Q and Verma, I. NF- κ B REGULATION IN THE IMMUNE SYSTEM. 2002. Nature . 2; 725-735.
- 62.- Karin, M. The InB kinase (IKK) complex as a critical regulator of immune responses. 2005. International Congress Series 1285; 97–103.
- 63.- Bonizzi, G and Karin, M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. 2004. TRENDS in Immunology. 25; 280-289.
- 64.- Mohamed, M and McFadden, G. NF κ B inhibitors Strategies from poxviruses. 2009. Cell Cycle 8:19; 3125-3132.
- 65.- Ghosh, S and Karin, M. Missing Pieces in the NF-B Puzzle. 2002. Cell, 109; S81–S96.
- 66.- Dong, H. Shim, K and Chow, J. Molecular mechanisms underlying Ca²⁺ mediated motility of human pancreatic duct cells. 2010. American Journal of physiology- cell physiology. 299; C1493-C1503.
- 67.- Putney, J. Broad, L. Braun, F. Leivremont, J and Bird, G. Mechanisms of capacitative calcium entry. Journal of Cell Science 114; 2223-2229.
- 68.- Yamaguchi, M. Role of regucalcin in calcium signaling. 2000. Life Sciences. 66; 1769-1780.
- 69.- Chattopadhyay, N. Biochemistry, physiology and pathophysiology of the extracellular calcium-sensing receptor. 2000. Elsevier Science. PPI: S1357-2725(00)00031-5.
- 70.- Nowycky, M and Thomas, A. Intracellular calcium signaling. 2002. Journal of Cell Science 115; 3715-3716.
- 71.- Hofer, A. Another dimension to calcium signaling: a look at extracellular calcium. 2005. Journal of Cell Science 118; 855-862.
- 72.- Hernán, J. Bonilla, F. Cañas, C and Tobón, G. 2014. Calcio, canales, señalización intracelular y autoinmunidad. Reumatol Clin. 10(1); 43–47.
- 73.- Boonnak, K. Bonnie, S. Gina, D and Marovich, M. Human Fc γ RII Cytoplasmic Domains Differentially influence Antibody-Mediated Dengue virus Infection. 2013. The Journal of Immunology. 10; 40-49.

74.- Khiyam. H, Hargreaves. H, Roghanian. A, Oldham. R, Chan.C, Mockridge. I, Chowdhury. F, Frendeus. B, Harper. K, Strefford. J, Cragg. J, Glennie. M, Williams. A and French. R. Upregulation of FcγRIIb on monocytes is necessary to promote the superagonist activity of TGN1412. 2015; Blood: 125 (1).

75.- Hernández. L. Transducci'on de señales del receptor FcγRIIIB. UNAM. Mexico,D.F. 1-63.