



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA FAGOCITOSIS MEDIADA POR CD13
EN CÉLULAS MONOCÍTICAS**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
OFELIA MUÑOZ PALETA**

TUTOR PRINCIPAL

**Dr. Enrique Ortega Soto
Instituto de Investigaciones Biomédicas**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dra. María Eugenia Torres Márquez
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina**

**Dra. Isabel Soto Cruz
Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza**

Ciudad de México. Abril, 2016



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.

Esta tesis la dedico con todo mi amor y cariño a mi familia:

A mi papá, José Francisco Muñoz cuyo legado nos mantiene unidos, por darme la confianza de creer en mí misma e inculcarme el amor a mi familia. A mi mamá, Catalina Paleta, por su amor, trabajo y apoyo a mis decisiones. A mi hermana Miri por su apoyo, franco e incondicional. Por tener las palabras acertadas en cada situación, porque no desiste en apoyarme en mis sueños. A mi hermana Fabis, por sus cuidados y ayuda desde siempre. Por sus cálidos abrazos y atinados regaños. A mis sobrinos: Rony, Ilse, Manne y Nata, por ser fuente de alegrías y darme su mejor sonrisa. Gracias por ser mi baluarte y ejemplo a seguir; por reprenderme y motivarme a seguir adelante en cada situación, alegre o apremiante. Porque sin su ayuda esto no sería posible. Esto va por ustedes.

Agradecimientos

A D' s. “Bendito Eres Tú, HaShem nuestro D' s, Rey del Universo que nos ha concedido vida, nos sostuvo, y nos hizo posible llegar a esta ocasión”.

A la Universidad Nacional Autónoma de México. Por su apoyo generoso a través de sus múltiples instancias.

Le agradezco enormemente al Dr. Enrique Ortega, por el espacio y tiempo brindados en el laboratorio. Gracias Doc, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo. Por brindarme sus conocimientos, su orientación, confianza y paciencia. Por su sólido compromiso para finalizar este proyecto.

Al comité tutorial, conformado por la Dra. Isabel Soto y la Dra. María Eugenia Torres, por su guía en la realización de esta tesis.

A mis amigos y compañeros de laboratorio. Ely, gracias por tus consejos y ayuda. Por compartirme tu experiencia. Todo tu apoyo fue fundamental para ver finalizado este proyecto. Gracias por tu amistad, que brinda ese calor necesario fuera de casa. Ileana, gracias por tu asesoría, que fue primordial en la parte inicial de este proyecto; por tu confianza y permitirme colaborar en tu trabajo. Diego, Andrea y Clau, también les agradezco por su asistencia en la parte experimental. Andrea, gracias por tu amistad y afable compañía. Clau, gracias por tus pláticas motivadoras. Ely, Ileana, Andrea, Su, Loops, Ale, Natalia, Ana Diana, Enrique Jr y Diego les agradezco no sólo su ayuda, sino su amistad dentro y fuera del laboratorio. Gracias a todos, por comer a las 2pm y hacer mi estancia en el laboratorio (y fuera de él) más alegre y amena.

Al personal del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, cuyo trabajo permitió mantener un ambiente y espacio ordenados para la realización experimental de esta tesis. Agradezco particularmente al QFB. Carlos

Castellanos por su asesoría en unidad de citofluorometría. A todo el personal del Posgrado en Ciencias Bioquímicas, especialmente a Lety García, Antonio Bolaños y la M. en C. Norma Trejo; por la gestión de los distintos trámites a lo largo de la maestría.

A mis amigos, viejos y nuevos. A Mildred, Jhona y Luis Ángel, por sus consejos, compañía y apoyo, siempre cálidos y firmes. A Arturo y Diego, cuya amistad se refrenda con el paso de los años. Agradezco, en general a todas las personas que me brindaron su ayuda en mi estancia en la Cd. de México, y que hicieron que esta experiencia fuera agradable y llena de enseñanzas.

Finalmente, agradezco al Jurado de examen integrado por la Dra. Yvonne Rosenstein, la Dra. Gohar Gevorgyan, El Dr. Edgar Zenteno, la Dra. María Elena Ibarra y la Dra. Gladis del Carmen Fragoso. Por su tiempo y atenciones destinados a la lectura de esta tesis, y cuyos consejos me permitieron tener una mejor versión de ella.

Hago extensivo mi agradecimiento al CONACYT por la beca (288895) que me otorgó para la realización de mis estudios de maestría.

Investigación realizada gracias a financiamientos del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM (IN210314) y CONACYT (178803). Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

I.RESUMEN

CD13 es una proteína transmembranal tipo II, con actividad de exopetidasa, y que también ha sido caracterizada como receptor de membrana. Esta última función lo ha relacionado en procesos biológicos como la adhesión celular y la fagocitosis. La caracterización de la participación de CD13 en la adhesión celular y la fagocitosis se ha realizado con anticuerpos monoclonales (mAbs) debido a que se desconoce el ligando natural que active estos procesos. El entrecruzamiento de CD13 con el mAb452 induce la agregación celular y la fagocitosis de partículas. Estos datos se han reproducido con otros mAbs, como el WM15 y el MY7. En cambio el entrecruzamiento de CD13 con los mAbC y mAbE inhibe la adhesión celular mediada por CD13. El efecto de los mAbC y mAbE en la fagocitosis mediada por CD13 no ha sido explorado previamente. Debido a que la adhesión celular y la fagocitosis comparten vías de señalización, y a que los mAbC y mAbE ejercen un efecto inhibitor en la adhesión celular, es posible que el entrecruzamiento de CD13 con estos mAb no induzca la fagocitosis de partículas, como sí ha sido observado con el mAb452. Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó el papel de los mAbC y mAbE en la fagocitosis mediada por CD13. Se encontró que el entrecruzamiento de CD13 con fragmentos Fab de los mAbC y mAbE induce la fagocitosis de partículas. Esto se traduce en la activación de la cinasa Syk y en la producción de especies reactivas de oxígeno, ambos eventos relacionados con la fagocitosis. Por otro lado, se demostró que el entrecruzamiento de CD13 con los mAbC y mAbE, al igual que con el mAb452, induce la activación de CR3. En conjunto estos datos sugieren que el mecanismo principal de activación de CD13 como receptor fagocítico mediado a través de los anticuerpos mAbC y mAbE es su agregación en la membrana; y este mecanismo podría estar relacionado con otras vías de señalización mediadas por CD13, como la activación de CR3.

II. CONTENIDO

I. RESUMEN	I
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Fagocitosis	1
1.1.1. Receptores Fagocíticos	1
1.1.2. Transducción de señales en la fagocitosis	4
1.1.2a. Reconocimiento y unión de la partícula a la célula fagocítica	4
1.1.2b. Eventos tempranos de señalización.....	5
1.1.2c. Polimerización de actina y formación del fagosoma	6
1.1.2d. Formación del fagosoma	10
1.1.3. Maduración del fagosoma: el fagosoma como organelo microbicida	10
1.1.3a. Acidificación del fagosoma	11
1.1.3b. Producción de especies reactivas de oxígeno	11
1.2. CD13	13
1.2.1. Expresión tisular	13
1.2.2. Síntesis y localización subcelular	13
1.2.3. Estructura.....	14
1.2.4. Implicaciones funcionales de CD13	15
1.2.4a. Receptor viral.....	17
1.2.4b. Adhesión celular	17
1.2.4c. Modulador fagocítico	19
1.2.4d. CD13 es un receptor fagocítico	20
1.3. mAbC y mAbE	21
2. JUSTIFICACIÓN	24
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS	26
4.1. Objetivo general	26
4.2. Objetivos particulares	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1 Obtención de fragmentos Fab de los mAb452, mAbC y mAbE	27
5.1.1. Purificación de los mAbs 452, C y E.....	27
5.1.2. Fraccionamiento de los mAbs 452, C y E.....	27
5.1.3. Purificación de los fragmentos Fab 452, C y E	28
5.2. Células	29
5.2.1. Línea celular THP-1	29
5.2.2. Macrófagos derivados de monocitos humanos (hMDM)	29
5.3. Preparación de partículas fagocitables	30
5.4 Preparación de células fagocíticas y citometría de flujo	31

5.5. Ensayos de fagocitosis selectiva	32
5.6. Detección de la de Syk por entrecruzamiento de CD13 con partícula fagocítica	33
5.7. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno asociada a la fagocitosis mediada por CD13.....	34
5.8. Activación de CD11b inducida por el entrecruzamiento de CD13 con los fragmentos Fab452, FabC o FabE	35
6. RESULTADOS	36
6.1 Generación de fragmentos Fab a partir de los anticuerpos 452, C y E, específicos para CD13.....	36
6.2. Los fragmentos FabC y FabE son capaces de inducir fagocitosis mediada por CD13 en células THP-1.	40
6.3. Los fragmentos FabC y FabE también son capaces de inducir fagocitosis mediada por CD13 en hMDM.	45
6.4. El entrecruzamiento de CD13 por la partícula fagocitable mediada por los Fab452, FabC y FabE induce la fosforilación de Syk en células THP-1.	49
6.5. El entrecruzamiento de CD13 a través de los Fab452, FabC y FabE con partícula fagocitable induce la fosforilación de Syk en hMDM	52
6.6. La fagocitosis a través de CD13, mediada por los Fab452, FabC y FabE induce la producción de ROS en hMDM-M1	54
6.7. El entrecruzamiento de CD13 con Fab452, FabC y FabE induce la activación de CR3.....	57
7. DISCUSIÓN	58
8. CONCLUSIONES.....	68
9. PERSPECTIVAS	69
10. FIGURAS SUPLEMENTARIAS	70
11. BIBLIOGRAFÍA	71

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Fagocitosis

La fagocitosis es el mecanismo celular que consiste en el reconocimiento e ingestión de partículas grandes, con diámetros mayores a 0.5 μm . Este proceso es definido por ser mediado por un receptor, ser dependiente del rearrreglo del citoesqueleto de actina e independiente de clatrina. Entre las partículas que pueden ser fagocitadas, se encuentran células muertas o apoptóticas, microorganismos y partículas inertes [1-4].

La fagocitosis es un mecanismo empleado por una gran variedad de organismos, desde amibas hasta vertebrados. En organismos unicelulares, este mecanismo es empleado principalmente con fines nutrimentales, mientras que en organismos multicelulares, la fagocitosis es crítica en procesos como el desarrollo embrionario, la homeostasis tisular y la inmunidad [5, 6]. En organismos pluricelulares, la fagocitosis es un distintivo de células especializadas pertenecientes al sistema inmunológico, incluyendo a monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos. Debido a su alta capacidad fagocítica, estas células son colectivamente nombradas como “fagocitos profesionales” [7]. Los fagocitos profesionales constituyen la primera línea de defensa desplegada por el organismo cuando se enfrenta con microorganismos. Además de esto, los fagocitos profesionales participan en la remodelación y/o reparación tisular [8]. En circunstancias especiales [9], otros tipos celulares como los fibroblastos o las células epiteliales, también son capaces de llevar a cabo la fagocitosis, aunque con una menor capacidad, por lo que son denominados como “fagocitos no profesionales” [7]. La distinción primordial entre fagocitos profesionales y no profesionales, radica en la expresión de una gran variedad de receptores fagocíticos expresados únicamente por los fagocitos profesionales [6, 7].

1.1.1. Receptores Fagocíticos

Las células fagocíticas tienen la capacidad de reconocer una gran diversidad de ligandos, gracias a la expresión correspondiente de receptores con especificidades distintas. Algunos de estos receptores sólo participan en la unión de la partícula a la célula, incrementando la eficacia de su internalización, pero sin ser capaces de inducirla por sí solos

[10, 11]. Los receptores fagocíticos primarios son aquellos que además de reconocer a la partícula, pueden desencadenar las vías de señalización para la internalización de ésta [2, 3]. La manera más aceptada para categorizar a un receptor como fagocítico, recae en su expresión ectópica: un receptor puede ser considerado como fagocítico si es capaz de inducir la ingestión de partículas al ser expresado en algún tipo celular no fagocítico [5].

Los receptores fagocíticos son estructuralmente diversos e incluyen una gama de familias de receptores, como la superfamilia de las inmunoglobulinas (como los receptores Fc γ R, que incluye a los Fc γ RI, IIa, IIc y IIIa), integrinas (por ejemplo CR3, CR4, $\alpha_5\beta_1$ y LFA-1), receptores “scavenger” (tales como SR-1, CD36 y MARCO), lectinas tipo C (como Dectina-1, DC-SIGN y el receptor de manosa), moléculas de adhesión (por ejemplo CEACAM) y glicoproteínas (como CD44) [10, 12].

Según el origen de la partícula, los receptores fagocíticos pueden ser clasificados en dos grandes grupos: aquellos que median la fagocitosis de cuerpos extraños, como microorganismos patogénicos, y otros que internalizan cuerpos endógenos, como células apoptóticas [12]. El reconocimiento de cuerpos extraños por receptores fagocíticos puede ocurrir directa o indirectamente. La unión indirecta involucra moléculas intermediarias endógenas, llamadas opsoninas, que son depositadas en los cuerpos extraños, y que median la asociación de la partícula con los receptores fagocíticos. Dentro de las opsoninas más estudiadas se encuentran las inmunoglobulinas y un fragmento del componente 3 del complemento (iC3b), las cuales son reconocidas por los receptores fagocíticos Fc γ (Fc γ R) y del complemento 3 y 4 (CR3, CR4), respectivamente [13]. En contraste, la interacción directa involucra el reconocimiento de estructuras en la superficie de la partícula, como los “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs, por sus siglas en inglés), por receptores fagocíticos. Los receptores que reconocen PAMPs se conocen como “receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés)” [11, 13-15]. En la Tabla 1 se muestran algunos receptores fagocíticos y sus ligandos conocidos.

Los receptores de cuerpos endógenos, reconocen marcadores de superficie en células apoptóticas, que las distinguen de células sanas. El marcador más característico de

células apoptóticas es la fosfatidilserina. [12]. En la Tabla 1 se muestran distintos receptores para cuerpos apoptóticos, así como sus respectivos ligandos.

Tabla 1. Receptores fagocíticos humanos y sus ligandos (Adaptado de Flannagan 2012 y Freeman, 2015) [5, 12].	
RECEPTORES	LIGANDOS
1. RECEPTORES DE CUERPOS EXTRAÑOS	
RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES DE PATÓGENOS (PRRs)	
Dectina-1 (CLEC7A)	B1,3-glucano
Receptor de manosa (CD206)	manano
BAI1	Lipopolisacáridos
Receptores scavenger	
Receptor scavenger A (CD204)	Lipopolisacárido, ácido lipoteicoico
CD36	Eritrocitos infectados con <i>Plasmodium falciparum</i>
MARCO	Bacterias gram positivas y gram negativas
RECEPTORES DE OPSONINAS	
Receptores Fc	
FcγRI (CD64)	IgG1 = IgG3 > IgG4
FcγRIIa (CD32a)	IgG3 ≥ IgG1 = IgG2
FcγRIIc (CD32c)	IgG
FcγRIIIa (CD16a)	IgG
FcαRI (CD89)	IgA1, IgA2
FcεRI	IgE
Integrinas	
CR3 (αMβ2, CD11b/CD18, Mac-1)	iC3b
CR4 (αVβ2, CD11c/CD18, gp150/95)	iC3b
α5β1	Fibronectina, vitronectina
CR1 (CD45)	Lectina de unión a manano, C1q, C4b, C3b
2. RECEPTORES DE CUERPOS APOPTÓTICOS	
Receptores para fosfatidilserina	
TIM-1	Fosfatidilserina
TIM-4	Fosfatidilserina
BAI1	Fosfatidilserina
Stabilin-2	Fosfatidilserina
CD300f	Fosfatidilserina
Integrinas	
αVβ3	MFG-E8, Del-I, vitronectina, vWF, PECAM-1, tenascina, BSP, osteopontina, trombospondina, LAP-TGFβ, fibrinógeno
αVβ5	MFG-E8, Del-I, vitronectina, osteopontina, BSP
Receptores scavenger	
CD36	Lípidos oxidados (fosfatidilserina, fosfatidilcolina)
SCARF-I	Fosfatidilserina opsonizada con C1q
Receptor scavenger A (CD204)	Lipopolisacárido, ácido lipoteicoico
Receptores TAM	
LRP1 (CD91)	Gas6, proteína S
	C1q, calreticulina

1.1.2. Transducción de señales en la fagocitosis

Las vías de señalización desencadenadas para la fagocitosis son particulares para cada receptor. Además, durante un proceso fagocítico en condiciones fisiológicas, diferentes receptores pueden ser activados simultáneamente, y esto dar como resultado una respuesta fagocítica compleja. A razón de las diferencias en los procesos fagocíticos mediados por los distintos receptores, la “fagocitosis” es un término amplio que hace referencia a un conjunto de fenómenos fenotípicamente relacionados, pero molecularmente distintos [15, 16].

Para fines didácticos, la fagocitosis puede ser dividida en cuatro etapas (Figura 1A): 1) el reconocimiento y unión de la partícula a la célula fagocítica; 2) el reclutamiento de los receptores en la membrana y señalización temprana; 3) la extensión de la membrana alrededor de la partícula y, 4) el sellado de la membrana que envuelve a la partícula, al juntarse y fusionarse los pseudópodos membranales.[5, 17].

1.1.2a. Reconocimiento y unión de la partícula a la célula fagocítica

El inicio de la fagocitosis es dependiente de la unión y agrupamiento de múltiples receptores fagocíticos interaccionando con sus respectivos ligandos, lo que permite incrementar la avidéz de la unión y la inmovilización de la partícula.[18, 19]. La unión de múltiples receptores es facilitada por la naturaleza dinámica del citoesqueleto de los fagocitos. Estas células constantemente extienden proyecciones de membrana dependientes de actina para monitorear a sus alrededores, de modo que la unión de la partícula a la célula es un proceso activo [12, 20].

A pesar de la extensa gama de condiciones en las que los ligandos pueden ser expuestos a los receptores, todos los blancos fagocíticos tienen una propiedad en común: presentan a la célula fagocítica un arreglo multivalente de ligandos. Aparentemente, la mayoría de los receptores fagocíticos requieren únicamente de su agrupación en el plano de la membrana para ser activados, tal es el caso de los Fc γ Rs o Dectina-1. Otros receptores requieren además de cambios conformacionales para ser activados, como el CR3 [5, 21]. La activación de los receptores fagocíticos permite el inicio de la transducción de señales para

la fagocitosis y otras respuestas, como si se desencadenará o no una respuesta pro-inflamatoria o anti-inflamatoria [18, 19].

1.1.2b. Eventos tempranos de señalización

Existen puntos convergentes en las vías de señalización fagocíticas desencadenadas por los diferentes receptores fagocíticos, y todas culminan en la activación de moléculas que coordinan el rearrreglo del citoesqueleto de actina y la remodelación de la membrana celular para poder internalizar a la partícula.

La vía de señalización fagocítica mejor caracterizada es la activada por los FcγRs activadores (FcγRI, FcγRIIa y IIC; y FcγRIIIa), y es empleada como base para el estudio de las vías de señalización fagocíticas de otros receptores. La señalización a través de los FcγRs activadores de la fagocitosis, inicia cuando éstos se agrupan lateramente, lo que ocasiona la fosforilación de sus dominios ITAM (motivos de activación basados en tirosina, por sus siglas en inglés) por cinasas de tirosinas itinerantes de la familia Src, como Lyn, Hck y/o Fgr. Este proceso es replicado numerosas veces según la membrana va envolviendo a la partícula[12]. Se ha postulado que la agregación de las cadenas con ITAMs activa la señal porque incrementa la concentración local de moléculas de señalización[22]. Los ITAMs fosforilados sirven de punto de anclaje y activación de la cinasa Syk. La cinasa Syk activada fosforila una variedad de sustratos intracelulares para la activación de funciones efectoras, como la activación transcripcional, el rearrreglo del citoesqueleto y la liberación de mediadores inflamatorios (Figura1.1B). Syk es esencial para la fagocitosis mediada por los FcγRs, ya que macrófagos de ratones *syk*^{-/-} no pueden completar la fagocitosis mediada por estos receptores, quedando arrestada en la formación de la copa fagocítica, evidenciando además que existen eventos de señalización tempranos independientes de Syk [12, 23].

La activación de la cinasa Syk también ha sido evidenciada durante la fagocitosis mediada por otros receptores, como Dectina-1 y CEACAM3, poseedores de motivos tipo ITAM[18, 24, 25], y en la fagocitosis mediada por CR3 y CD44. A pesar de que la activación de Dectina-1 activa a Syk en procesos fagocíticos, se ha demostrado en algunos tipos celulares, en los que se ha inhibido a Syk o que son deficientes de ella, que esta cinasa no es esencial para la fagocitosis, pero sí para otras respuestas como la producción de especies

reactivas de oxígenos (ROS) [18, 26]. El papel de Syk en la fagocitosis mediada por CR3 es controversial. Inicialmente se asumió que la fagocitosis mediada por CR3 era independiente de Syk por carecer de motivos ITAMs, además de se observó que la fagocitosis mediada por CR3 no es afectada en macrófagos *syk*^{-/-}. Sin embargo, un estudio más reciente demuestra que Syk es fosforilada durante el proceso fagocítico y que el bloqueo de la expresión de Syk por activación del gen o por expresión de un alelo negativo, inhibe la internalización de partículas. El mecanismo de activación de Syk por receptores carentes de ITAMs tampoco es claro, por lo que se sugiere que proteínas adaptadoras como DAP-12 podrían participar en su activación[27].

1.1.2c. Polimerización de actina y formación del fagosoma

Todas las formas de fagocitosis tienen en común que la F-actina es reclutada debajo de la superficie de las partículas unidas a la célula en estructuras tridimensionales que permiten la extensión de la membrana para envolver a la partícula que se va a fagocitar. Esta estructura es denominada como copa fagocítica [13, 17, 20, 28, 29].

Las cinasa Syk activada fosforila a otras proteínas celulares que participan en la señalización, incluyendo moléculas adaptadoras como LAT, lo que lleva a la formación de complejos de señalización en la membrana, facilitándose la activación de enzimas involucradas en las vías de señalización como la PI3K, PLC γ , y otras[15].

La proteína transmembranal LAT se une a Syk y es fosforilada por ella. La fosforilación de LAT induce el reclutamiento de proteínas adicionales como Grb2, Gab2 y GrkII. Estas proteínas parecen ser críticas para la señalización, ya que en macrófagos deficientes de Gab2 o el silenciamiento de CrkII con RNAi se inhibe la fagocitosis [15, 30].

La señalización de Syk es requerida también para la eficiente fosforilación de PI3K. [3, 31]. PI3K, es reclutada para formar complejos con Syk y Gab2. Su reclutamiento es seguido de la fosforilación y su consecuente activación. Esta enzima genera a su vez PI-3,4,5-trifosfato (PIP3) a partir de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2). Durante la fagocitosis a través de los Fc γ Rs, la acumulación de PIP3 dirige la adición de membrana para proveer de la necesaria para la extensión de pseudópodos [18, 32]. Asimismo, el PI3P se acumula en la copa fagocítica y es requerido para la maduración del fagosoma [32].

La PLC γ actúa sobre fosfolípidos de inositol de la membrana, dando lugar a la generación de diacilglicerol (DAG) y de inositol 1,4,5 trifosfato (IP $_3$). El IP $_3$ tiene receptores en el retículo endoplásmico, y su unión causa la liberación de iones Ca $^{2+}$, que actúan como segundos mensajeros. El aumento de la concentración de Ca $^{2+}$ en el citosol, aunado a la producción de DAG, da lugar a la activación de miembros de la familia de las proteínas cinasas C ó PKC, con la resultante fosforilación de una serie de substratos que participan en la respuesta celular[24].

Las proteínas cinasas C (PKC) son una familia de cinasas de serina/treonina que son activadas por diacilglicerol (DAG), fosfatidilserina (PS) y en el caso de algunas isoformas, por iones Ca $^{2+}$. La inhibición farmacológica de PKC con estaurosporina o calfoestina C resulta en una disminución de la fagocitosis mediada por los Fc γ Rs, aunque no es claro el papel de cada isoforma en el proceso. Se ha sugerido que las isoformas clásicas de PKC participan en el estallido respiratorio inducido por Fc γ Rs, pues al depletar la célula de Ca $^{2+}$, este proceso se inhibe pero no la fagocitosis [30].

La cinasa ERK también se ha involucrado en la señalización a través de los Fc γ R. Esta cinasa pertenece a la familia de las cinasas de serina/treonina citosólicas activadas por mitógenos o MAP cinasas (MAPK). La activación de la vía de ERK media la comunicación entre el receptor y la vía de Ras, a través de la formación de complejos multiméricos entre proteínas adaptadoras y factores de intercambio de nucleótidos de guanina. En la activación mediada por Fc γ Rs se ha observado el ensamblaje de la proteína adaptadora Grb2 y la proteína intercambiadora de GTP: SOS. El complejo Grb2/SOS conduce a la activación de proteínas G de bajo peso molecular como Ras, Rac y Rho. (36, 37). Entre los substratos conocidos de ERK incluyen proteínas asociadas a citoesqueleto como la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK).

Aun cuando la cascada de señalización precisa que liga a los receptores fagocíticos activados con la polimerización de actina no está totalmente entendida, es claro que la familia de las Rho-GTPasas controla el rearrreglo del citoesqueleto de actina durante la internalización [15]. Los Fc γ Rs reclutan y activan a Cdc42, Rac1 y Rac2 [16, 18]. Las evidencias hasta ahora demuestran que, a través de la activación de distintas proteínas, Cdc42 puede

regular la extensión de los pseudópodos y que Rac1 participa en el cierre del fagosoma [31]. Durante la fagocitosis mediada por CR3, la acumulación de F-actina y la internalización de la partícula dependen de RhoA, y parecen ser dependientes de Rac1 y Rac2, e independiente de Cdc42[12, 33].

Como es el caso para los FcγRs, la fagocitosis mediada por Dectina-1 también involucra cinasas de la familia Src, así como PI3K, PKC, Cdc42 y Rac1. A pesar de que la activación de Dectina-1 en procesos fagocíticos activa a Syk, PI3K y Rac, se ha demostrado en algunos tipos celulares en que se ha inhibido Syk o en células deficientes de Syk, que esta cinasa no es esencial para la fagocitosis, aunque sí para otras respuestas inducidas por Dectina-1, como la producción de especies reactivas de oxígeno[18].

Durante la fagocitosis mediada por los FcγRs, el complejo nucleador Arp2/3 soporta la polimerización de actina. Arp2/3 promueve la formación de filamentos de actina ramificados al nuclear la polimerización del lado de un filamento existente. Arp 2/3 puede ser activado por factores promotores de nucleación: las proteínas del síndrome Wiskott-Aldrich (WASP)/ N-WASP y las proteínas de la familia Scar/WAVE, las cuales son efectores corriente debajo de Cdc42 y Rac, respectivamente. WASP es estimulado por la acción combinada de Cdc42 activa y PIP2. La formación de estos complejos es importante para el desarrollo de la copa fagocítica [34]. Los filamentos de actina requeridos durante la fagocitosis son polímeros dinámicos formados por la asociación continua de monómeros de actina en un extremo y disociación en el otro, y su formación precisa de la actividad de nucleadores.

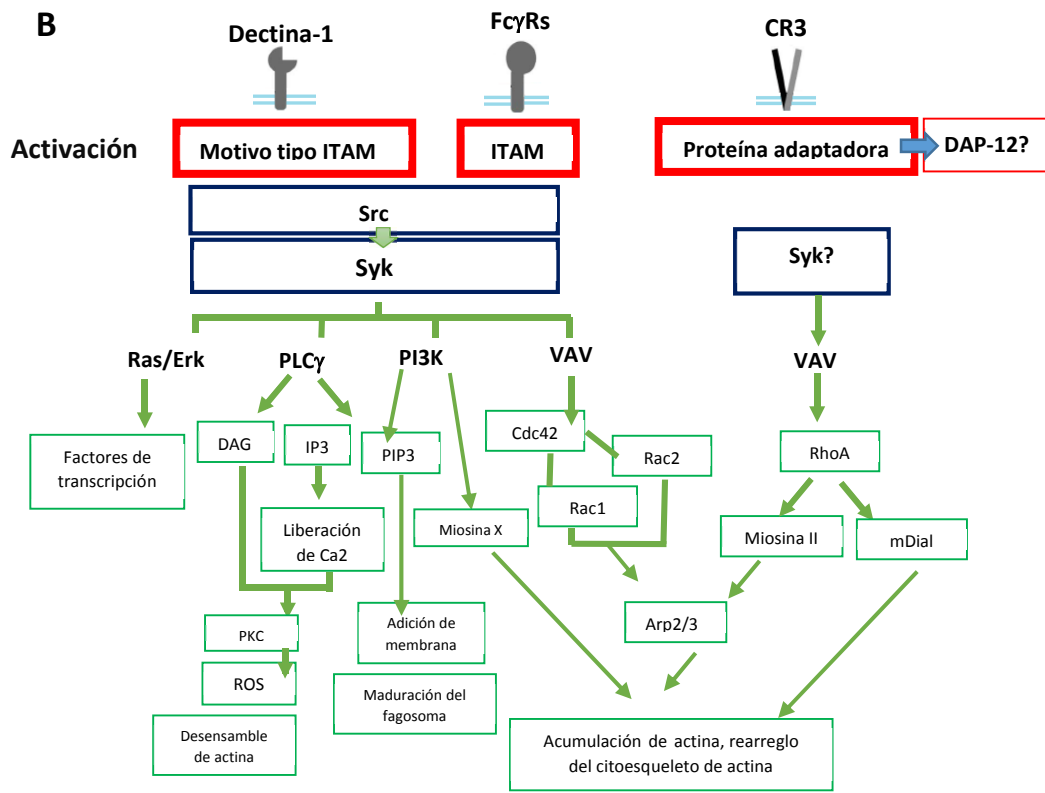
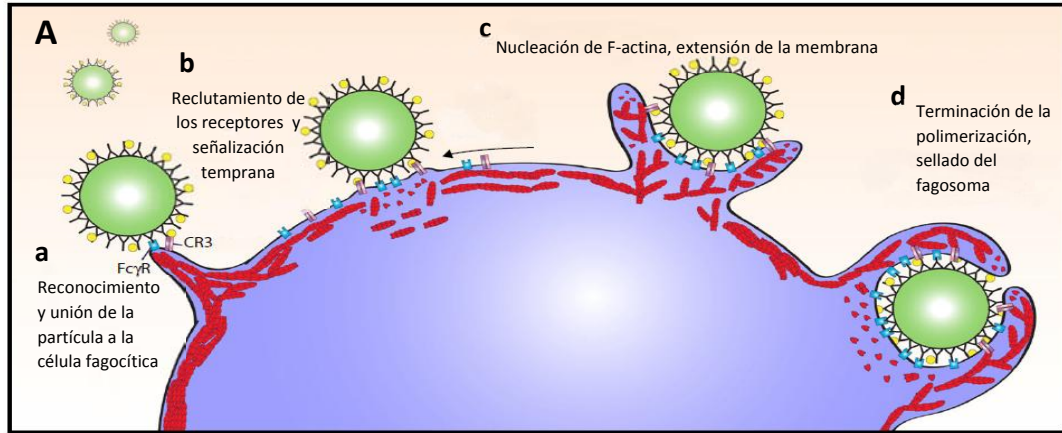


Figura 1.1. Vías de señalización en la fagocitosis. La vía de señalización es particular para cada receptor fagocítico. A) Para fines didácticos la fagocitosis puede ser dividida en cuatro pasos generales. a. Reconocimiento y unión de la partícula fagocitable. Extensiones de la membrana permiten explorar el ambiente en busca de partículas. b. La unión de la partícula a la célula permite la agregación de los receptores fagocíticos, dando inicio a la señalización intracelular temprana. c. Las vías de señalización convergen en la estimulación de la polimerización de actina alrededor de la partícula para envolverla. d. Después de envolver a la partícula, se estimula la despolimerización de actina alrededor de la partícula para permitir el sellado de la vesícula y dar origen al fagosoma. Adaptado de Spencer A. Freeman, Sergio Grinstein (2014) Phagocytosis: receptor, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunological Reviews*. 262: 193–215. B) La agregación de los receptores inicia la activación de cinasas de tirosina, incluyendo a cinasas de la familia Src y a Syk. Este paso es mediado en los FcγRs por el motivo ITAM; en Dectina-1, por el motivo tipo-ITAM; o en CR3 a través de moléculas adaptadoras. Esto es seguido del reclutamiento de proteínas adaptadoras que permiten la activación de enzimas modificadoras de lípidos, como PLC y PI3K; y de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) como Vav. Estas últimas moléculas a su vez activan a proteínas de la familia RhoGTPasas (Cdc42, Rac1, Rac2, RhoA), las cuales activan el complejo de nucleación de actina Arp2/3 complejos nucleadores de actina, lo cual dirige la polimerización de actina para la extensión de pseudópodos alrededor de la partícula.

1.1.2d. Formación del fagosoma

El ensamblaje de actina en el sitio de unión de la partícula es inducido segundos después de la ligación de los Fc γ Rs, iniciando la formación de la copa fagocítica que rodea la partícula y que se desensambla según va siendo formado el fagosoma. El desensamble de la copa fagocítica requiere de la desaparición de PIP2, el cual es mediado por PLC γ y estimulado por PI3K. La secuencia de pasos, unión del ligando, entrecruzamiento del receptores y fosforilación de tirosinas en el ITAM, es repetida muchas veces tanto como pseudópodos crecen alrededor de la superficie de la partícula a fagocitar. Los pseudópodos rodean a la partícula en una forma de “zipper” hasta que eventualmente se encuentran y se fusionan encerrando a la partícula, dando origen a un nuevo organelo celular: el fagosoma[13, 35].

1.1.3. Maduración del fagosoma: el fagosoma como organelo microbicida

El fagosoma recién formado es incapaz de llevar a cabo su tarea básica: degradar su contenido. Esta propiedad la adquiere a través de un complejo proceso de maduración. En un inicio, el fagosoma se fusiona secuencialmente con endosomas tempranos, endosomas tardíos y finalmente con lisosomas, formando así fagosomas tempranos, fagosomas tardíos y fagolisosomas, respectivamente [5, 13, 36]. Mientras ocurre esta transformación, los fagosomas se vuelven organelos ácidos, adquieren propiedades oxidativas y se enriquecen en hidrolasas. [13]. El fagosoma maduro es el organelo final microbicida y degradativo, que puede digerir proteínas, lípidos y carbohidratos [12].

El tipo de respuesta final de la célula fagocítica varía según la naturaleza de la partícula fagocitada y el receptor fagocítico a través del cual se llevó a cabo el proceso. Por ejemplo, la fagocitosis de un patógeno puede llevar a su degradación preservando determinantes antigénicos que pueden ser presentados a linfocitos, y a la inducción de respuestas inflamatorias. Contrariamente, cargos en el fagosoma derivados de cuerpos apoptóticos son rápidamente degradados en una forma inmunológicamente silenciosa[12, 13, 36]. Asimismo, la fagocitosis a través de los Fc γ Rs dirige a la producción de lípidos pro-

inflamatorios (como el ácido araquidónico) e intermediarios de especies reactivas de oxígeno, mientras que la fagocitosis a través de CR3 no lo hace [16].

En cuanto a la fagocitosis de patógenos, los fagocitos inician una vía para inducir la muerte de ellos, en parte dirigiéndolos a lisosomas que son ricos en enzimas hidrolíticas, y también orquestando la producción de especies reactivas de oxígeno en el lumen del fagosoma [13].

1.1.3a. Acidificación del fagosoma

La fusión con los lisosomas, convierte a los fagosomas en un organelo competentemente microbicida. Bioquímicamente, su interior es distinguido por un enriquecimiento de hidrolasas de la familia de las catepsinas, una pronunciada acidez en su lumen (pH 4-5-5), y la ausencia de PIP3, M6PR y LBPA. La acidificación del fagolisosoma es generada por V-ATPasas. Esta acidificación que por sí misma contribuye a la degradación de su blanco y restringe el crecimiento de microorganismos, es también requerida para la activación de las hidrolasas lisosomales (como las catepsinas D y L), que funcionan óptimamente a pH bajo. Este proceso ocurre dentro de la mayoría de los tipos celulares, incluyendo “los fagocitos no profesionales” como los fibroblastos, pero no así en células dendríticas inmaduras, las cuales parecen mantener activamente un pH alcalino dentro de sus fagosomas [4, 12].

1.1.3b. Producción de especies reactivas de oxígeno

La función primaria de la producción de ROS por fagocitos es matar a microorganismos. La producción de especies reactivas de oxígeno en los fagolisosomas es llevada a cabo por la isoforma NOX2 de la oxidasa de NADPH [37]. NOX2 es un complejo proteico constituido por proteínas integrales de membrana (gp91 phox y p22Phox) y proteínas solubles que existen como un complejo citosólico (p67phox, p47phox, p40phox)[38]; que se ensambla en respuesta a señales proinflamatorias para mediar la producción del anión superóxido (O_2^-) al transferir electrones de NADPH a oxígeno molecular[2]. La activación de NOX2 es altamente regulada, y es disparada por la unión de partículas, bacterias, hongos o mediadores inflamatorios solubles a receptores específicos

en la superficie de células fagocíticas. [15, 31, 37]. El O_2^- producido por NOX2 es por sí solo una especie citotóxica, pero también puede ser reducido para formar especies más reactivas. Las ROS derivadas de la acción de NOX2 representan una potente faceta microbicida de la respuesta antimicrobiana del macrófago, dado que sus componentes oxidan letalmente a carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos de los microorganismos [12, 37].

No todos los fagocitos montan una misma respuesta oxidativa dependiente de NOX2. Por ejemplo, la respuesta montada en los macrófagos varía dependiendo de su estado de activación. Macrófagos que son polarizados a M2 tienen una menor capacidad para producir ROS a través de la activación de la NOX2 debido a una menor expresión de gp90phox, mientras que macrófagos polarizados a M1, presentan una mayor producción de ROS [39]. En este sentido y parecido a la acidificación, los ROS fagosomales y NOX2 son componentes integrales que modulan la fisiología de fagosomas proinflamatorios [40].

1.2. CD13

La Aminopeptidasa N o CD13 (EC 3.4.11.2) es una exopeptidasa, perteneciente a la familia M1 de las zinc-metaloproteinasas denominadas gluzincinas [41]. Esta enzima ha sido descrita como una proteína multifuncional y muchas de las actividades biológicas en las que participa son independientes de su actividad como proteasa [42, 43]. Recientemente, nuestro grupo describió a CD13 como un receptor fagocítico primario, pero la vía de señalización ha sido poco caracterizada y otros aspectos implicados durante la fagocitosis aún no han sido precisados, como el mecanismo de activación de CD13 como receptor fagocítico y su ligando natural en este proceso.

1.2.1. Expresión tisular

La localización tisular de esta proteasa es amplia. CD13 puede ser encontrada en el epitelio renal, intestinal y tiroideo, en el sistema nervioso, células tipo fibroblasto, hígado y canalículos biliares, placenta, pulmón y en el músculo esquelético; así como en células endoteliales en procesos angiogénicos [44, 45]. También es expresado en células madre y, de interés para este proyecto, en células del sistema inmune del linaje mielomonocítico (monocitos, macrófagos y células dendríticas). Debido a que células T y B evolucionan a un estadio CD13 negativo tras haber madurado, CD13 ha sido empleada como un marcador mielomonocítico [46].

También una forma soluble de CD13 (sCD13) puede ser detectada en el suero. La presencia de sCD13 también ha sido reportada en la bilis, el fluido seminal humano, el fluido broncoalveolar y en el fluido sinovial [47].

1.2.2. Síntesis y localización subcelular

CD13 es sintetizado como monómero en el retículo endoplásmico y su homodimerización no covalente ocurre antes de que sea transportado fuera del retículo endoplásmico, previamente a su glicosilación en el Golgi [48]. La localización subcelular de CD13 se subyace, al ser una proteína transmembranal, a compartimentos de la vía secretoria, a la membrana citoplasmática, endosomas y fagosomas tempranos. En la membrana plasmática, CD13 ha sido localizado en balsas lipídicas en monocitos,

sinoviocitos y enterocitos [49]. Asimismo, no es sintetizada como zimógeno, por lo que no requiere de procesamiento proteolítico para ser activa como enzima [50, 51].

1.2.3. Estructura

CD13 es una proteína transmembranal tipo II, constituida por 967 aminoácidos. Está altamente glicosilada y tiene un peso molecular aproximado de 160kDa, sus residuos de carbohidratos constituyen alrededor del 40% del peso molecular. Su porción citosólica está constituida por apenas 8 aminoácidos. La porción transmembranal probablemente consta de una hélice alfa, con una longitud de 32 aa[52]. En la porción extracelular se pueden identificar 4 dominios estructurales (I-IV), y un tallo rico en Ser/Thr, que une al dominio I con la región transmembranal (Figura 1.2A). El dominio II posee el plegamiento tipo termolisina y contiene a los motivos característicos de las metaloproteinasas M1, $^{388}\text{HEXXHX}_{18}\text{E}^{411}$ y $^{352}\text{GXMEN}^{356}$, presentes en el sitio de unión a zinc y en el sitio catalítico, respectivamente. CD13 se expresa en la superficie celular como un homodímero, y la interfaz dimérica es mediada por interacciones no covalentes entre residuos del extremo C-terminal, pertenecientes únicamente al dominio IV de cada monómero(Figura 1.2B) [53].

Recientemente la estructura cristalográfica de CD13 de humano fue determinada. Tras el alineamiento estructural con la aminopeptidasa ERAP1, que posee características estructurales similares a las de CD13, fue posible identificar que CD13 puede adquirir una conformación abierta o cerrada. La conversión de una conformación a otra depende del movimiento de un asa flexible de ocho residuos ($^{891}\text{YGGGSFSF}^{898}$) del dominio IV. El movimiento de esta asa depende a su vez de la unión de sustratos o inhibidores de CD13 a su sitio catalítico (Figura1.2C). En el análisis de distintos complejos de CD13 con moléculas unidas a ella, se identificó que esta asa puede asumir diferentes conformaciones particulares, dependiendo de la molécula unida al sitio catalítico. Esto evidencia que la unión de algunos sustratos o ligandos puede estabilizar a CD13 en su conformación abierta o cerrada [53].

Debido a que CD13 es una proteína transmembranal, el arreglo dimérico dado en el lado extracelular lleva a una estructura tipo arco en ese lado de la membrana. Esta arquitectura es de particular importancia dada la sugestión de que cada monómero puede

asumir la conformación abierta o cerrada, y el paso de conformación cerrada a abierta conduce a un cambio grande, de 54 a 102 Å, en la distancia entre los extremos amino de cada monómero unido a la membrana. La conversión de un dímero abierto/abierto a uno cerrado/cerrado por lo tanto lleva a un cambio conformacional grande, que podría ser la base de los eventos de transducción de señal a los que CD3 ha sido asociado(Figura1.2E,F yG) [53].

1.2.4. Implicaciones funcionales de CD13

La inhibición de la actividad enzimática de CD13, ya sea con inhibidores farmacológicos o anticuerpos monoclonales (mAbs), evidenció su capacidad de participar en múltiples procesos biológicos independientemente de su actividad como proteasa. Así que, tras la unión de un ligando, CD13 puede funcionar como una enzima, como un receptor y/o como una molécula de señalización [42].

CD13 regula la actividad de numerosos péptidos al procesarlos enzimáticamente por su extremo N-terminal. Por ejemplo encefalinas, angiotensinas, tuftsinas, citocinas y quimiocinas y proteínas de matriz extracelular. Dependiendo de la localización tisular de CD13 y los sustratos enzimáticos que ahí se encuentren, CD13 como enzima ha sido relacionado en la diferenciación y la motilidad celular, entre otros procesos. Algunos fenómenos complejos en los que participa CD13, como la angiogénesis, la invasión tumoral y la quimiotaxis, pueden ser el resultado de la combinación de sus tres funciones. En cambio, en otros procesos como la unión y endocitosis de partículas virales, la fagocitosis y la adhesión celular, CD13 puede fungir como receptor y molécula de señalización[42]. A continuación, se exponen algunos procesos en los que participa CD13, particularmente como receptor y molécula de señalización.

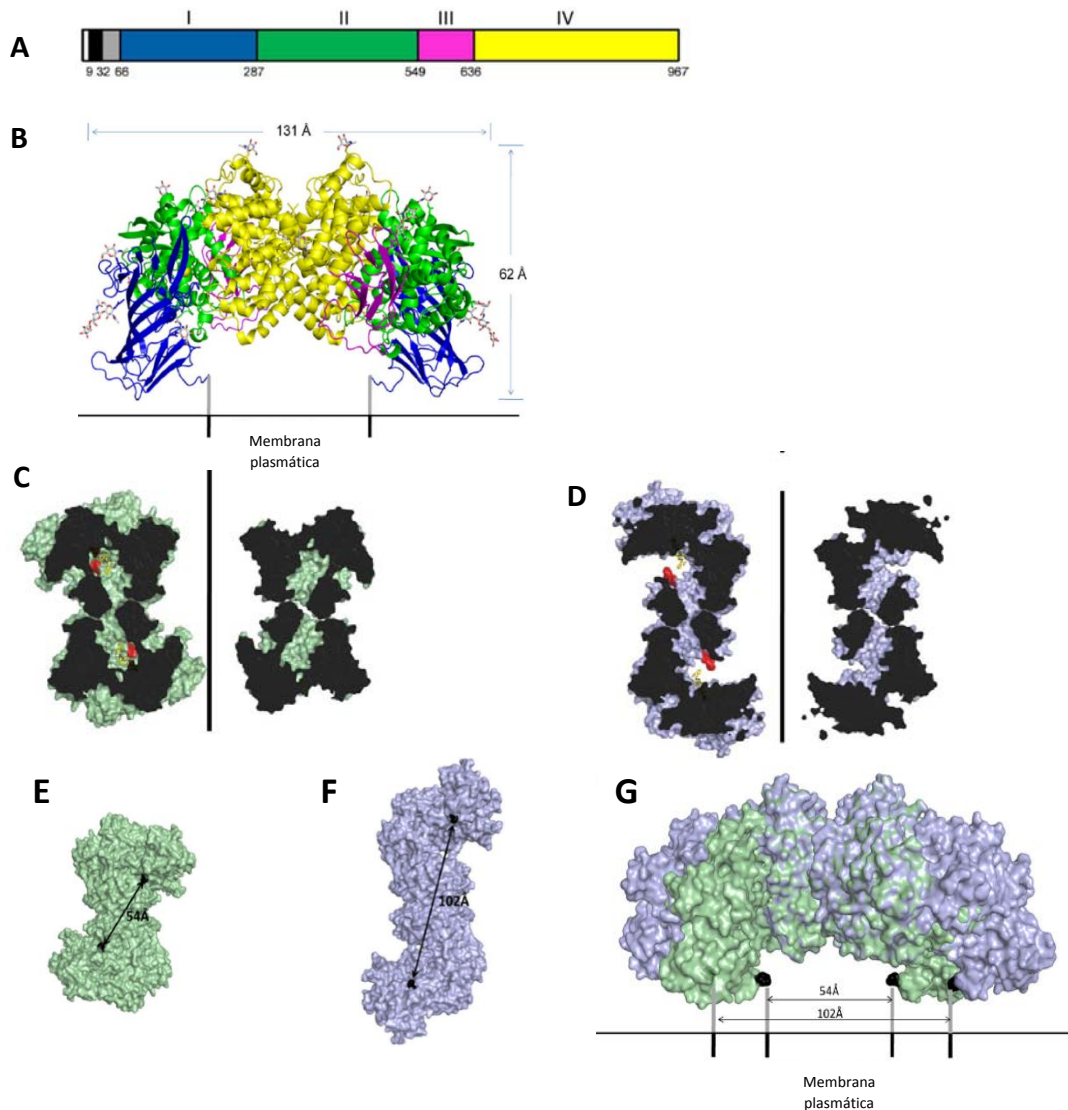


Figura 1.2. Estructura del dímero de CD13. A) Organización lineal de los dominios de CD13 de humano. En blanco se muestra el dominio citoplasmático, en negro el segmento transmembranal, en gris el tallo rico en Ser/Thr. Los dominios extracelulares I-IV se muestran en azul, verde, rosa y amarillo, respectivamente. El número debajo de la estructura indica el sitio de inicio de cada dominio. B) Diagrama de listones del dímero de CD13, se muestra su probable orientación respecto a la membrana plasmática, con los dominios coloreados como en A). C) y D) Vista de libro abierto de la superficie de CD13 seccionada transversalmente. C) Estructura cerrada de cada monómero de CD13 con la cavidad interna catalítica de CD13, el asa móvil se muestra en rojo, en complejo con el péptido AngIV coloreado en amarillo, unido al sitio catalítico. D) Representación de la estructura abierta de cada monómero, con el sitio catalítico expuesto a solventes. E) y F) Representación de la superficie de CD13 visto desde la membrana, con cada monómero modelado en la estructura E) cerrada y F) abierta. G) Superposición de la conformación cerrada (verde, E) y abierta (azul, F). El extremo N-terminal que conecta a la región transmembranal de cada monómero está coloreado en negro. E), F) y G) Los valores numéricos hacen referencia a la distancia entre los extremos N-terminal de cada monómero. (Wong, A.H., Zhou, D., Rini, J.M. (2012) The X-ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 36804-13).

1.2.4a. Receptor viral

Ha sido reportado que CD13 media la endocitosis de virus, proteínas, péptidos y anticuerpos en distintos tipos celulares. Han sido descritas dos formas de endocitosis mediadas por CD13, una caveola-dependiente y la otra clatrina-dependiente[42, 54, 55].

Una de las funciones mejor conocidas de CD13 es su rol como receptor viral es varias especies. En el humano, CD13 es un receptor para coronavirus humano 229E (HCoV-229E). La adición de partículas virales del HCoV-229E en células de humano de origen monocítico induce la agregación de CD13 en la membrana celular, formación de fibras de actina longitudinales y conlleva a la internalización del complejo CD13- HCoV-229E. Importantly, resultados similares fueron obtenidos con el empleo de anticuerpos anti-CD13 [54].

Otro trabajo ha implicado a CD13 en la infección viral por el citomegalovirus humano (hCMV)[56]. En este trabajo se comprobó que todas las células que son susceptibles a la infección de hCMV *in vitro* expresan CD13 y que la infección se bloquea tras el tratamiento con anticuerpos anti-CD13. La unión del hCMV a monocitos, induce el aumento de Ca^{2+} intracelular que resulta en la inhibición de la diferenciación de monocito a macrófago. Este mismo efecto puede ser inducido con el tratamiento de los monocitos con anticuerpos anti-CD13. Este conjunto de datos expone a CD13 como una molécula receptora en la membrana celular y capaz de inducir señalización celular, y que el uso de anticuerpos puede reflejar las consecuencias funcionales de la unión de un ligando polivalente natural.

1.2.4b. Adhesión celular

CD13 es capaz de mediar la adhesión celular homotípica y heterotípica, tanto *in vitro* como *in vivo*. De una manera general, en el conjunto de trabajos que describen a CD13 como molécula de adhesión, se ha requerido del entrecruzamiento de CD13 para observar su participación en la adhesión celular, ya sea inducido con partículas virales o con anticuerpos monoclonales (mAbs), lo cual sugiere que CD13 participa en la adhesión celular contribuyendo con señales bioquímicas que regulan este fenómeno.

En un trabajo pionero de nuestro laboratorio se demostró que el entrecruzamiento de CD13 con el mAb452 en células U937 y monocitos humanos aislados de sangre periférica, induce la agregación homotípica (AH); de una manera dosis y tiempo dependiente, es decir la agregación de células del mismo tipo; a diferencia de la agregación heterotípica que involucra la interacción de diferentes tipos celulares. En este estudio, se emplearon otros mAbs anti-CD13: el mAb WM15, el mAb MY7 y el mAb WM4.7; los dos primeros inhibidores de la actividad enzimática. Interesantemente, los mAb WM15 y MY7 también fueron capaces de inducir agregación homotípica a través de CD13, mientras que el entrecruzamiento de CD13 con el mAb WM4.7 no indujo agregación a ninguna concentración. Debido a que los mAbs inductores de la AH (452, WM15 y MY7) se unen a un sitio cercano al de unión de Zn, y a que el anticuerpo WM4.7 se une a otro sitio, se sugirió que la capacidad de inducir agregación celular de los tres mAbs inductores, depende de su unión a un sitio particular, cercano al sitio catalítico de CD13. En este trabajo también se demostró que la AH mediada por CD13 depende de la activación de cinasas de la familia Src y MAPK; PI3K y PKC, pues su inhibición farmacológica abate la AH. Asimismo, se observó que durante la AH, CD13 se redistribuye a las zonas de contacto entre célula y célula, sugiriendo que CD13 tiene una participación activa en este proceso. Aunado a esto, las proteínas Grb2 y Sos coinmunoprecipitan con CD13 de lisados de células U937 en estado basal o agregadas, y debido a que Grb2 es una proteína adaptadora involucrada corriente arriba en la vía de señalización de Erk1/2 y MAPK, se sugiere que esta podría ser la vía para la activación de ellas por medio de CD13[57].

Se ha demostrado también que CD13 participa en el proceso de adhesión heterotípica. Al entrecruzar a CD13 con mAbs (452, Y2K y WM15) en células U937 y ponerlas con contacto con monocapas de células endoteliales, se observa una mayor adhesión de las células monocíticas en comparación con células que no tuvieron entrecruzamiento de CD13. Al igual que la AH, es necesario el entrecruzamiento de CD13 para observar su participación en la adhesión heterotípica. La agregación heterotípica también requiere de la señalización de cinasas de tirosina y rearreglos del citoesqueleto de actina[57, 58].

En una caracterización más profunda de las vías de señalización desencadenadas en la agregación celular mediada por CD13, se demostró que la adhesión de células monocíticas a células endoteliales depende de la fosforilación de Tyr6, localizada en la porción citoplasmática de CD13. Con el empleo del inhibidor farmacológico de las cinasas de la familia Src, se identificó la participación de estas cinasas en la fosforilación de CD13. También se confirmó la activación de otras cinasas, como FAK y ERK, en la señalización corriente debajo de la fosforilación de CD13. La sustitución de la Tyr6 de CD13 por una fenilalanina, resulta en la inhibición de la adhesión de monocitos a células endoteliales *in vitro*, lo que valida a CD13 como una molécula capaz de mediar la transducción de señales. Además, experimentos realizados *in vivo* sugieren que la fosforilación de la Tyr6 de CD13 es un evento crucial durante la adhesión y/o tráfico de células monocíticas a sitios de inflamación. Interesantemente, con la expresión de moléculas de CD13 quiméricas en células monocíticas murinas, se demostró CD13 media la agregación celular homo- y heterotípica a través de interacciones homofílicas, es decir de la interacción de una molécula de CD13 de una célula con otra en la otra célula[59].

Durante el estudio de los mecanismo por los que CD13 median la agregación celular, en nuestro grupo de investigación se han producido dos mAbs anti-CD13, el mAb C y el mAb E. La importancia de los mAbC y mAbE se remarca por poseer efectos funcionales diferentes a las observadas sobre la agregación homotípica y heterotípica con los anticuerpos activadores de la agregación celular (mAb452, WM15 y MY7). En un apartado más adelante, se describen los efectos del entrecruzamiento de CD13 con estos anticuerpos y algunas características de ellos.

1.2.4c. Modulador fagocítico

CD13 es capaz de modular positivamente la señalización en la fagocitosis mediada por los FcγRs y otros receptores fagocíticos de la inmunidad innata. Durante la fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG en células de humano de origen monocítico, se observó que CD13 se redistribuye a las zonas de interacción célula-partícula, y que CD13 era internalizado en el fagosoma. También se observó que tras la agregación de los Fcγ Rs, CD13 colocalizaba parcialmente con estos receptores; y al agregar a CD13, el FcγRI se redistribuye

a la misma zona de la membrana. La redistribución de CD13 junto con los FcγRs (FcγRI y FcγRII) simultáneamente fue reportado por otro grupo, en el que muestran que CD13 co-localiza a la misma zona de la membrana con esos receptores fagocíticos después de ser agregados [60]. El papel funcional de la colocación de CD13 con los FcγR, se comprobó tras el entrecruzamiento de CD13 en células expuestas a partículas fagocitables por los FcγRI, y observar un aumento en la fagocitosis de las partículas (220%) en comparación con células en las que no fue entrecruzado CD13. Al evaluar la activación de Syk, se encontró que el entrecruzamiento simultáneo de CD13 y FcγRI, aumentaba el nivel y tiempo de fosforilación de Syk, comparado con la fosforilación de Syk inducida sólo por la agregación de los FcγRI[61].

En otro trabajo de nuestro equipo, se demostró que la agregación de CD13 con el mAb452 en macrófagos y células dendríticas derivados de monocitos de sangre periférica, modula positivamente la fagocitosis de partículas de zimozán y *E. coli* inactivadas por calor, sugiriendo que CD13 también puede modular positivamente la fagocitosis mediada por receptores de la inmunidad innata. En este conjunto de proyectos, se observó la fagocitosis de partículas dirigidas selectivamente a CD13, lo que sugirió que CD13 podría ser propiamente un receptor fagocítico, y no sólo modular la señalización intracelular desencadenada por otros receptores [62].

1.2.4d. CD13 es un receptor fagocítico

Recientemente, nuestro grupo de trabajo examinó si CD13 puede funcionar como un receptor fagocítico primario. Los resultados obtenidos indicaron que CD13 es un receptor fagocítico competente, capaz de mediar la fagocitosis de partículas grandes (2-4 µm de diámetro), y las vías de señalización desencadenadas en este proceso involucran a Syk y PI3K[63].

El primer acercamiento para determinar la capacidad fagocítica de CD13, fue dirigir partículas fagocitables selectivamente hacia CD13 en células de humano de origen monocítico y se observó una fagocitosis significativa de estas partículas, en comparación con las células recubiertas con otro anticuerpo control o sin tratamiento. La internalización también se ratificó por microscopía confocal, comprobando que las vesículas contienen

partículas grandes, cuya internalización requiere del rearrreglo del citoesqueleto de actina. Este hecho fue ratificado con el empleo de citocalasina-D (inhibidor de la polimerización de actina) disminuyó significativamente la fagocitosis de las partículas.

Debido a que las vías de señalización de algunos receptores fagocíticos canónicos requieren de la activación de Syk y PI3K, se evaluó si la fagocitosis a través de CD13 requiere de la activación de estas moléculas. Por citometría de flujo se determinó que la fagocitosis mediada por CD13 involucra la activación de Syk, encontrando que su pico de fosforilación ocurre a los 45 segundos. Sin embargo, tras el empleo de BAY 61-3606, se observó que la fagocitosis mediada por CD13 se redujo apenas un 35%, mientras que la fagocitosis mediada por el receptor FcγRI se inhibió totalmente a la misma concentración de BAY 61-3606. Estos datos sugieren que la activación de Syk contribuye a la fagocitosis mediada por CD13, pero no es esencial. En la evaluación de la participación de PI3K en la fagocitosis medida por CD13, se determinó el efecto de su inhibición en la fagocitosis mediada por CD13 y por los FcγRI en células de origen monocítico. Al igual que la fagocitosis mediada por los FcγRI, la fagocitosis a través de CD13 fue inhibida significativamente. Esto sugiere que PI3K también es requerida en la fagocitosis mediada por CD13.

La expresión ectópica de CD13 en células no fagocíticas, las células epiteliales HEK293, posibilitó que estas células fueran capaces de internalizar partículas a través de CD13. Este experimento permitió descartar la contribución de los FcγRI y de otros receptores fagocíticos importantes en la fagocitosis mediada por CD13 observada en las células monocíticas. En conjunto, todos estos resultados proveen evidencia robusta de que CD13 es un receptor fagocítico primario.

1.3. mAbC y mAbE

El ligando natural de CD13 que induce la agregación celular mediada por CD13 aún no ha sido descubierto, por lo que es estudio de la participación de CD13 en este fenómeno ha sido hecho con mAbs anti CD13. Con la finalidad de identificar moléculas involucradas en la interacción célula-célula en la AH inducida por el entrecruzamiento de CD13 con el

mAb452, en nuestro laboratorio se produjeron anticuerpos monoclonales capaces de inhibir la agregación inducida por el entrecruzamiento de CD13 (Claudia Garay et al, datos no publicados). El ensayo de selección de los anticuerpos inhibidores consistió en incubar a los monocitos de la línea U937 en presencia del sobrenadante de los hibridomas, y posteriormente agregar el mAb452 y determinar si se inducía o no agregación celular. Los sobrenadantes de los hibridomas C y E mostraron ser capaces de inhibir la agregación celular inducida por el entrecruzamiento de CD13, por lo que los hibridomas productores de estos anticuerpos fueron clonados, obteniendo así a los anticuerpos mAbC y mAbE. Con el empleo de un kit comercial fue determinada la subclase de los anticuerpos: el mAbC pertenece a la subclase IgG1, mientras que el mAbE, a la subclase IgG2b. Con el empleo de la técnica de western blot de inmunoprecipitados de células U937 con el mAbC o mAbE, y posteriormente también de espectrometría de masas, se determinó que la molécula reconocida por los mAbs C y E, es también CD13.

Mediante ensayos de competencia por unión a células U937, se determinó que los mAbC y mAbE no se unen al mismo sitio de unión que el mAb452, descartando que el efecto de inhibición de la agregación inducida por el mAb452 se debiera a que estos anticuerpos se unieran al mismo sitio de unión del mAb452. En cambio, se observó que los mAbC y mAbE inhiben entre sí mismos su unión a CD13, lo que sugiere que se unen al mismo sitio o a sitios muy cercanos, o que la unión del otro ejerce un efecto estérico que imposibilita la unión del otro.

En el estudio del efecto de los mAbC y mAbE sobre la agregación inducida por el mAb452, se identificó que la previa incubación de las células U-937 con cada uno de estos anticuerpos fue capaz de inhibir la agregación homotípica observada (Figura 1.3B). Sorpresivamente, también se observó que el mAbC o el mAbE, son capaces de inducir la desagregación de células U-937 previamente agregadas con el mAb452 (Figura 1.3C).

Otra característica que diferencia al mAb452 del mAbC o mAbE, es el efecto de la unión de estos últimos sobre la actividad enzimática. Se observó que los mAbC y mAbE son capaces de inhibir significativamente la actividad enzimática de CD13; mientras que a las mismas concentraciones, el mAb 452 no lo hace. Debido a las particularidades de los mAbC

y mAbE, éstos representan una útil herramienta de estudio de la funciones de CD13, ya que a pesar de que existe una gran variedad de anticuerpos anti CD13, ninguno de ellos ha sido reportado como inhibidor de la agregación mediada por CD13.

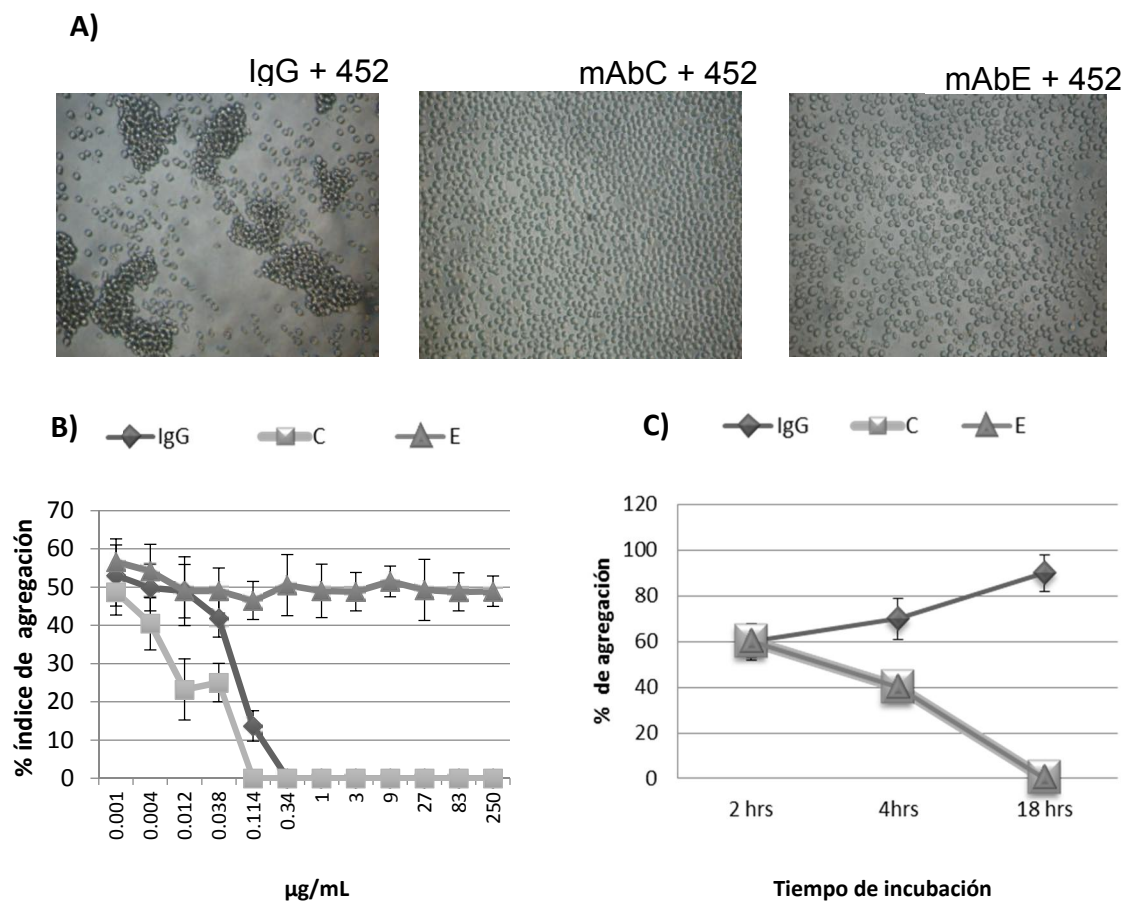


Figura 1.1 Inhibición de la agregación homotípica mediada por CD13, con los mAbC y mAbE. Células U-937 en placas de 96 pozos fueron incubadas por 1h a 37°C con las dosis indicadas de los mAbC y mAbE o IgG control. A) Imágenes representativas de la agregación homotípica (AH) con el siguiente tratamiento: las células fueron incubadas con los anticuerpos indicados, posteriormente el anti-CD13 mAb452 fue agregado a una concentración de 1µg/mL por 2h adicionales. B) Los datos son presentados como índices de agregación (IA)=[número de células detectadas por el software como colonias azules en cada imagen (células agregadas/número total de células detectadasx100)]. C) Desagregación de células U-937 inducida por los mAbC y mAbE, para ellos monocitos fueron incubados por 2h con el mAb452 para inducir su agregación, luego las células fueron incubadas con los mAbC y mAbE o IgG a 37°C y se determinó el porcentaje de agregación a diferentes tiempo de incubación. Porcentaje de agregación fue determinado bajo microscopia de luz como el número de células en agregados/número total de célulasx100 (Claudia Garay et al, datos no publicados).

2. JUSTIFICACIÓN

La adhesión celular y la fagocitosis son procesos celulares que requieren del rearrreglo del citoesqueleto de actina, por lo que muchos receptores fagocíticos han sido reportados también como moléculas de adhesión y viceversa. Las vías de señalización que las subyacen han sido ampliamente estudiadas y muestran ser complejas. Sin embargo algunos principios básicos resaltan: ambos procesos requieren de la activación de receptores de membrana, cuya activación señala para la activación del rearrreglo del citoesqueleto de actina a través de la familia de los Rho-GTPasas[20, 34, 64].

CD13 es una molécula transmembranal tipo II, con actividad exopeptidasa, que ha sido ampliamente descrita como molécula de adhesión[57, 61, 65, 66] y recientemente como receptor fagocítico[63]. La caracterización de CD13 como molécula de adhesión, ha evidenciado que CD13 es capaz de mediar la activación de distintas moléculas, como la familia de la Src cinasas, las MAPK, PI3K, y PKC[57, 61, 65, 66]. Importantemente, estas moléculas también son activadas en las vías de señalización fagocíticas de otros receptores[12]. La caracterización de CD13 en la adhesión celular y la fagocitosis se ha realizado con mAbs anti CD13 porque se desconoce el ligando natural que active la adhesión celular y la fagocitosis mediadas por CD13. El entrecruzamiento de CD13 con el mAb452 induce la adhesión celular y la fagocitosis de partículas en células de origen monocítico[63]; mientras que los mAbC y mAbE inhiben la adhesión celular. Existen otras diferencias entre el mAb42 respecto a los mAbC y mAbE, como el sitio de unión a CD13 y que estos últimos inhiben en mayor grado la actividad enzimática de CD13 (Claudia Garay y colaboradores, datos no publicados). El efecto inhibitorio de los mAbC y mAbE en la adhesión celular puede deberse a que el entrecruzamiento de CD13 con estos mAbs no induce la activación de la señalización de mediada por CD13, y que esto dependa a su vez del sitio de unión a CD13, pues ha sido determinado que la unión de determinados sustratos a CD13 puede estabilizar a CD13 en una conformación abierta o cerrada; y el cambio de estos estadios conformacionales ha sido propuesto como la base de la asociación de CD13a la transducción de señales [53].

El efecto del entrecruzamiento de CD13 con los mAbC y mAbE en la fagocitosis mediada por CD13 no ha sido estudiado anteriormente. Debido a que la adhesión celular y la fagocitosis comparten vías de señalización, y a que los mAbC y mAbE ejercen un efecto inhibitor en la adhesión celular, es posible que el entrecruzamiento de CD13 con estos mAb no induzca la fagocitosis de partículas, como sí ha sido observado con el mAb452. El estudio del efecto de los mAbC y mAbE en la fagocitosis mediada por CD13 es importante porque puede proporcionar información sobre el mecanismo de activación de CD13 como receptor fagocítico.

3. HIPÓTESIS

El entrecruzamiento de CD13 con los fragmentos Fab de los anticuerpos monoclonales C y E empleando partículas fagocitables, no induce la fagocitosis de estas partículas en células de origen monocítico.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Determinar si el entrecruzamiento de CD13 con los fragmentos FabC o FabE empleando una partícula fagocitable induce su fagocitosis en células THP-1 y hMDM (macrófagos de humano derivados monocitos de sangre periférica).

4.2. Objetivos particulares

- Determinar comparativamente el porcentaje de fagocitosis e índice fagocítico empleando los fragmentos Fab452, FabC y FabE, en las células THP-1 y hMDM.
- Determinar si el entrecruzamiento de CD13 con los Fab452, FabC o FabE empleando una partícula fagocitable, induce la fosforilación de Syk en las células THP-1 y hMDM.
- Determinar si el entrecruzamiento de CD13 con los Fab452, FabC o FabE empleando una partícula fagocitable induce la producción de especies reactivas de oxígeno, en hMDM, no polarizados y polarizados al estadio M1.
- Determinar si el entrecruzamiento de CD13 con los Fab452, FabC o FabE con un anticuerpo secundario soluble induce la activación de CR3 en hMDM.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de fragmentos Fab de los mAb452, mAbC y mAbE

5.1.1. Purificación de los mAbs 452, C y E.

La hibridomas 452, C y E fueron mantenidos en crecimiento en medio de cultivo RPMI-1640 (GIBCO) suplementado con 2mM de glutamina, aminoácidos esenciales(GIBCO 11140-050), piruvato de sodio (GIBCO 11360-070), 100 UI/ ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 10mM de bicarbonato de sodio y 3% de suero bovino fetal, en una incubadora húmeda a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂, manteniendo una confluencia entre el 60-90%. El sobrenadante recolectado fue sometido a centrifugación, a 4500 rpm por 10 min y se ajustó su pH con buffer de Tris 2M, pH=8; y se mantuvo en refrigeración hasta la purificación de los anticuerpos.

La purificación de los mAbs 452, C y E de los sobrenadantes obtenidos se realizó a través de columnas de afinidad. La purificación del mAbE se realizó en columnas de proteína A de *Staphylococcus aureus* unida covalentemente a perlas de agarosa (Invitrogen 15918-014), la cual muestra una mayor afinidad por la porción Fc de anticuerpos del isotipo IgG2b. La purificación de los mAbs 452 y C, se llevó a cabo con la proteína G-agarosa (Invitrogen, 15920-010), ya que la proteína G muestra una mayor afinidad por la porción Fc de anticuerpos del isotipo IgG1. Posteriormente, el anticuerpo fue eluido de las columnas con buffer de glicina pH 2.8, los eluidos recolectados fueron restablecidos a un pH entre 7-8 por adición de buffer Tris 2M., y fueron mantenidos en refrigeración hasta su fraccionamiento.

5.1.2. Fraccionamiento de los mAbs 452, C y E

El fraccionamiento enzimático de los mAbs 452 y C, se llevó a cabo empleando a la enzima ficina inmovilizada en agarosa (Thermo Scientific 44881), mientras que el fraccionamiento del mAb E se realizó con la enzima papaína(Sigma Aldrich). La elección de estas enzimas se realizó en base al isotipo de cada mAb. Los mAbs fueron concentrados por centrifugación en filtros de poro de 10kDa, en ciclos de 15 min a 4000 g a temperatura

ambiente y a la par, se concentraron en buffer de digestión para el fraccionamiento (para los mAbs 452 y C en buffer de Tris 50mM, EDTA 20mM; y para el mAb E, buffer de fosfato de sodio 20mM, 10 mM EDTA; pH 7.0). Posteriormente, se cuantificó su concentración empleando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 280nm.

Los protocolos de activación de las enzimas se realizaron como lo indica el proveedor. La enzima ficina se empleó a una concentración de 0.16 U/mg de anticuerpo, mientras que la papaína se usó a una concentración de 20mg de Ab/ ml de suspensión de papaína. Los mAbs fueron expuestos a la enzima correspondiente, en presencia de 1 mM de cisteína para la digestión con ficina y 20 mM de cisteína para la digestión con papaína. La reacción se realizó por 6 hrs, en incubación en baño con agua a 37°C, con agitación constante.

La reacción con papaína fue finalizada por adición de buffer Tris-HCl 10mM, pH7.5 y centrifugación, mientras que la digestión con ficina por centrifugación a 1000g, por 10 min. Posteriormente, los fragmentos obtenidos fueron lavados con buffer Tris 10mM mediante centrifugación en conos de filtros con poro de corte de 10kDa, en ciclos de 15 min a 4000g a temperatura ambiente, hasta obtener una concentración aproximada de 1.5mg/mL. Los fragmentos fueron almacenados a 4°C hasta su purificación.

5.1.3. Purificación de los fragmentos Fab 452, C y E

Los fragmentos Fab de los anticuerpos fueron purificados empleando columnas de afinidad, para retener los fragmentos Fc en ellas. Para los Fab E, se empleó una columna de proteína A, mientras que para los Fab452 y FabC, se emplearon columnas de proteína G.

El procedimiento fue el siguiente: se hizo pasar por la columna el volumen no saturante para la columna, recolectando esta solución. Se añadió buffer de lavados, con la finalidad de recuperar los fragmentos Fab no unidos a la columna, pero que aún se encontraran dentro de ella. Se cuantificó la concentración de proteína en las fracciones recuperadas por espectrofotometría a una longitud de onda de 280 nm, y fueron almacenados en refrigeración a 4°C, hasta su uso. Las columnas fueron eluidas con buffer de glicina 200mM, pH 2.8, para posibilitar la purificación de más fracciones de fragmentos Fab.

La pureza de los fragmentos Fabs se verificó en geles de SDS-poliacrilamida al 10%, en condiciones no reductoras y reductoras. Los geles fueron teñidos con solución de azul Coomassie por 25 min y desteñidos, para poder visualizar las bandas de proteína en el gel.

5.2. Células

5.2.1. Línea celular THP-1

La línea celular THP-1 (ATCC, Manassas, VA, EUA) fue cultivada en medio de cultivo RPMI-1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, 1mM de piruvato de sodio, 0.1mM de aminoácidos no esenciales, 0.1mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina y 100ug/mL de estreptomina (todos estos reactivos de GIBCO, Grand Island, NY, EUA). Los cultivos fueron mantenidos en una incubadora con atmósfera húmeda a 5% de CO₂ y 37°C.

5.2.2. Macrófagos derivados de monocitos humanos (hMDM)

Paquetes leucocitarios de donadores sanos fueron obtenidos del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, con previa autorización del Comité de Bioética institucional para su uso en experimentos. Los macrófagos derivados de monocitos (hMDM) fueron obtenidos a partir de células mononucleares de sangre periférica humana. Para ello, se aislaron las células mononucleares de los paquetes leucocitarios de donadores sanos por gradiente de densidad utilizando una solución de Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Science, Uppsala, Sweden). Las células mononucleares se lavaron cuatro veces con PBS a pH7.4 y fueron cultivadas en RPMI-1640 con 10% de suero autólogo inactivado por calor, más los suplementos estándar, por 30 min a 37°C para permitir la adhesión de los monocitos a la caja de cultivo. Posteriormente, las células no adherentes fueron eliminadas por lavados, y las células adherentes fueron cultivadas por siete días en RPMI-1640 con 10% SFB más suplementos estándar, en una atmósfera húmeda a 37°C con 5% de CO₂.

Para los ensayos de fagocitosis, la determinación de la fosforilación de Syk y activación de CD11b, los hMDM fueron empleados tras siete días de incubación como se

describió arriba. Los macrófagos fueron despegados de la caja de cultivo delicadamente por pipeteo, luego fueron lavados y empleados en los experimentos.

En cuanto a los ensayos de determinación de la producción de ROS, los hMDM fueron cultivados por siete días después de su aislamiento. Posteriormente, fueron lavados e incubados por 48 hrs en medio RPMI-1640 completo en presencia o ausencia de 30 ng/mL de IFN γ , para obtener macrófagos polarizados al estadio M1 o mantenerlos en M0, respectivamente. Al término del tiempo de la incubación, los hMDM M1 y M0 fueron despegados gentilmente por pipeteo, lavados y empleados para los experimentos.

5.3. Preparación de partículas fagocitables

Como partícula fagocitable empleamos eritrocitos de carnero modificados para unirse a las células a través de un receptor en particular. Los eritrocitos fueron incubados en solución Alserver por una semana a 4°C. Posteriormente fueron teñidos o no con CFSE (Molecular Probes, C1157). Para teñirlos, 1.2×10^9 eritrocitos/mL fueron incubados con 10 mM de CFSE por 20 min a 37°C, después fueron incubados por 25 min más con 25% de SFB a 37°C. Luego fueron lavados con PBS-BSA al 0.1%. Posteriormente, los eritrocitos marcados con CFSE o sin teñir, fueron incubados con 250 μ g/mL de sulfo-NHS-biotina (Thermo Scientific, EZ-link Sulfo NHS-biotin 21217) por 20 minutos a 4°C en agitación suave. En seguida, los eritrocitos fueron lavados, e incubados con 35 μ g/mL de estreptavidina (Calbiochem) por 20 min a 4°C. Nuevamente, los eritrocitos fueron lavados y después se incubaron con fragmentos F(ab) $'$ 2 biotinilados de IgG de cabra anti-Ig de ratón por 45 min a 4°C. Los eritrocitos fueron lavados y se dejaron a una concentración de 1×10^9 células/mL para emplearlos en los distintos protocolos. Estos eritrocitos los denominamos como EBS-Fabs (Figura 5.1).

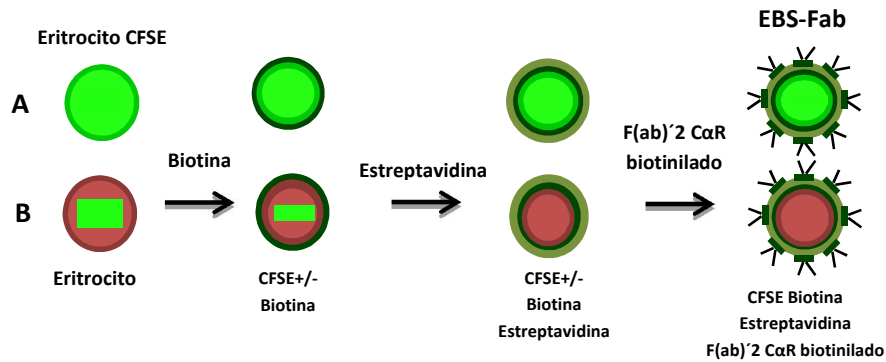


Figura 5.1. Construcción de las partículas fagocitables. Eritrocitos de carnero fueron teñidos con A) CFSE , o no B); y después fueron recubiertos secuencialmente con biotina, estreptavidina, y finalmente con F(ab)'2 de anticuerpos de cabra anti-ratón. Estas partículas las denominamos EBS-Fab.

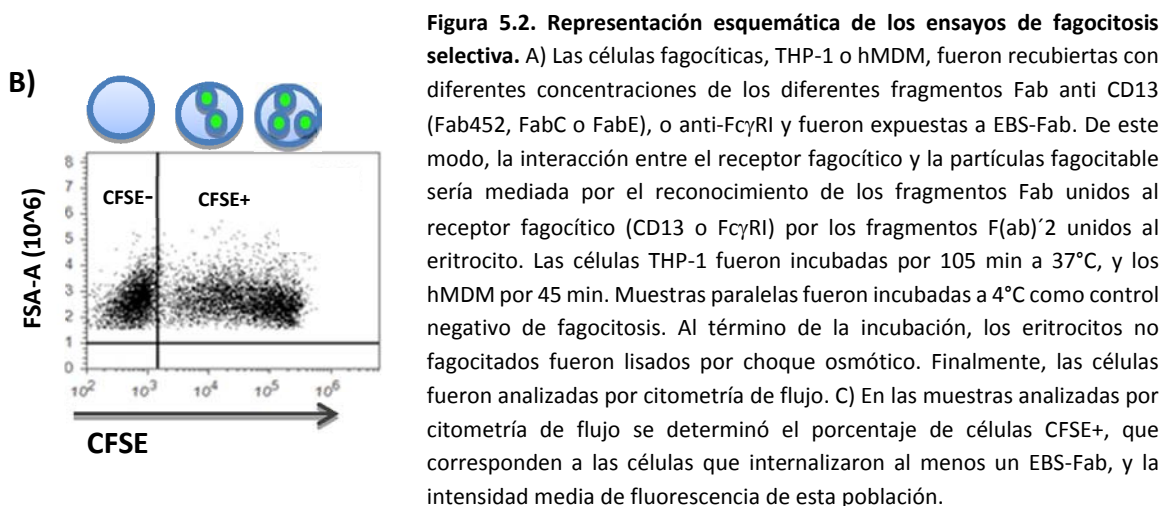
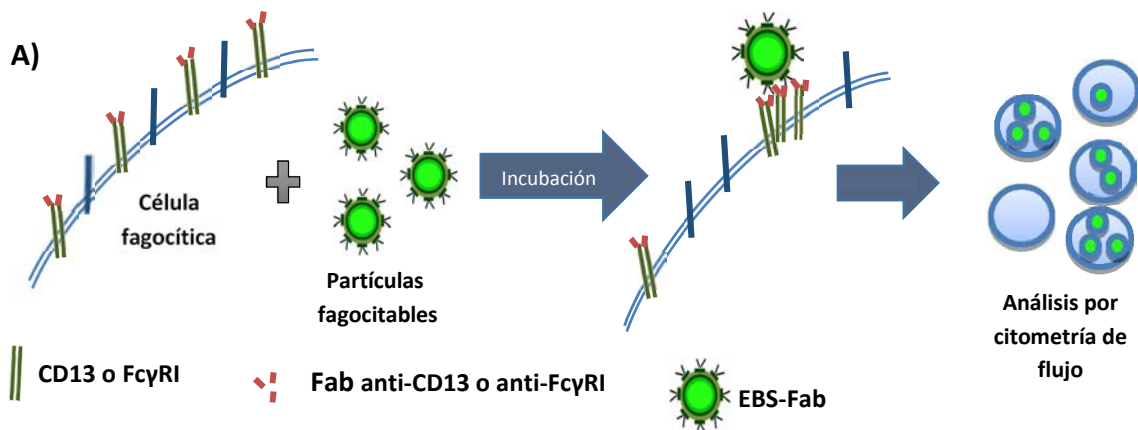
5.4 Preparación de células fagocíticas y citometría de flujo

Con la finalidad de realizar los diferentes ensayos experimentales o para analizar la expresión de moléculas en la superficie de la membrana, células THP-1 o hMDM fueron recubiertos con los diferentes fragmentos Fabs anti CD13 (Fab452, FabC o FabE) o anti FcγRI (Fab32.2). Para ello, 1×10^6 de células fagocíticas, THP-1 o hMDM, fueron incubadas con 2, 0.2 ó 0.02 μg de fragmentos Fab452, FabC o FabE; o con 4 μg de los fragmentos Fab del mAb32.2 o sin tratamiento, en 250 μL de medio RPM1-1640 con 10% SFB, por 30 min a 4°C. Las células fueron lavadas, y se mantuvieron en medio RPMI con 10% SFB para su uso en los diferentes ensayos experimentales.

Por otro lado, para determinar por citometría de flujo la expresión de CD13 o FcγRI, o verificar la adecuada unión de los distintos fragmentos Fab a las células, una muestra de estas células fue tratada con un anticuerpo secundario. Para estos fines, 1×10^5 de células fueron incubadas en 200 μL de PBS-SFB 0.1% con una dilución 1:300 del anticuerpo secundario IgG de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC por 30min a 4°C. Las células se lavaron y se analizaron por citometría de flujo. Se determinó la intensidad media de fluorescencia, y ésta fue normalizada respecto a las células sin anticuerpo primario.

5.5. Ensayos de fagocitosis selectiva

Debido a que dirigimos a la partícula fagocitable hacia un receptor en particular, en este caso CD13 o FcγRI, denominamos estos ensayos como “fagocitosis selectiva” (Figura 5.2). La interacción entre la partícula fagocitable y el receptor fagocítico es a través del reconocimiento de los fragmentos Fab de ratón unidos a los receptores, por los fragmentos F(ab)´2 de cabra anti ratón unidos al eritrocito. Para este fin, células fagocíticas, THP-1 o hMDM previamente recubiertas con distintas concentraciones de fragmentos Fab452, FabC, FabE o Fab32.2 (apartado 5.4) fueron incubadas con los EBS-Fabs en una relación 1:20 de células fagocíticas y partículas fagocitables, respectivamente. Cada muestra fue dividida en dos partes, una de ellas fue incubada a 37°C por 45 min para los hMDM o por 105 min para las células THP-1, mientras que las muestras paralelas fueron incubadas a 4°C como



control. Al término de la incubación, los eritrocitos no internalizados fueron lisados por choque hipotónico (Figura 5.2A). La fagocitosis se cuantificó por citometría de flujo (Attune Acoustic Focusing Cytometer, Applied Biosystems, Foster City, USA), en presencia de azul tripano al 0.02% en buffer de citratos para apagar la fluorescencia extracelular y poder diferenciar entre la fluorescencia de las partículas fagocitadas de aquella de eritrocitos o fluorescencia extracelulares. Para el análisis de los datos, determinamos el porcentaje de células CFSE positivas, que representan las células que internalizaron al menos un eritrocito; y el índice fagocítico (IF), el cual lo determinamos como el producto del porcentaje de fagocitosis por la intensidad media de fluorescencia (las células que más fagocitaron, más fluorescentes son), el IF fue normalizado respecto a la muestra de células sin recubrimiento (Figura 5.2B).

5.6. Detección de la de Syk por entrecruzamiento de CD13 con partícula fagocítica

Células THP-1 o hMDM fueron mantenidas por 4hr en medio RPMI con 0.5% de SFB a 37°C y en atmósfera húmeda al 5% de CO₂, con la finalidad de disminuir la influencia del SFB en las vías de señalización. Después, las células, THP-1 o hMDM previamente recubiertas con fragmentos Fab anti CD13 (Fab452, FabC o Fab E); o con fragmentos anti-FcγRI (Fab32.2) o sin recubrimiento fueron incubadas con EBS-Fab a una relación 1:20 de célula fagocítica: partícula fagocitable, por 20 min a 4°C. Posteriormente, las células fueron incubadas a 37°C en baño de agua por distintos periodos (0, 20s, 40s, 1min, 3min y 5min) en medio completo. Inmediatamente, las células fueron fijadas con PBS-PFA a una concentración final de PFA de 1.5% (previamente temperado a 37°C), por 10min a temperatura ambiente. Después se procedió a permeabilizar a las células, para ello fueron resuspendidas en metanol absoluto con agitación fuerte e incubadas a -20°C por 45min. Después fueron incubadas por 10min con PBS-BSA al 1%, a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se incubaron con un anticuerpo anti-pSyk acoplado a PE (BD Biosciences, clona pY348) por 45 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron y se analizaron por citometría de flujo, empleando el equipo FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA). El análisis de los resultados obtenidos se realizó empelando la mediana de fluorescencia, normalizándola a la muestra del tiempo 0 de cada cinética. El uso

de la mediana en lugar de intensidad media de fluorescencia es útil en estos protocolos para reducir los efectos de los valores atípicos, debido a que los cambios observados en la detección de la fosforilación de Syk por este método son discretos.

5.7. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno asociada a la fagocitosis mediada por CD13

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se determinó empleando una forma modificada de fluoresceína, la Carboxy-H2DFFDA (Molecular Probes, C13293). Este reactivo es una forma acetilada y químicamente reducida de fluoresceína; y es usada como un indicador de especies reactivas de oxígenos dentro de las células. Esta molécula es convertida a una forma verde fluorescente cuando los grupos acetatos son removidos por las esterasas intracelulares y por la oxidación que ocurre dentro de las células debida a las ROS.

Para la realización de estos protocolos, hMDM M0 y hMDM M1 fueron recubiertos con 2µg de los disintos Fab anti CD13 o con 4µg de Fab32.2 como se explica en el apartado 5.4. Posteriormente, fueron resuspendidas en 1mL/millón de células, en buffer de solución salina de Hank (HBSS, por su sigla en inglés) a una concentración de 20µM de Carboxy-H2DFFDA, y fueron incubadas por 30min a 37°C. Luego, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 1mL de HBSS por cada millón de células. Posteriormente, se incubaron dos muestras por cada condición de 2×10^5 células, una de ellas en presencia de partículas fagocitables, a 37°C por 30min. Como control negativo se colocaron dos tubos de células sin recubrimiento con y sin eritrocitos, y como control positivo una muestra más de células sin recubrimiento con *E.coli* inactivadas por calor. Al término de la incubación, todas las muestras fueron colocadas en duplicados de 1×10^5 células en placas negras de fondo claro de 96 pozos, y se determinó la fluorescencia de las células debida a la oxidación de la carboxi- H2DFFDA por la presencia de ROS. Las muestras fueron excitadas a una longitud de onda de 490nm, y la emisión se determinó a 520 nm. Las células fueron mantenidas 1h más en incubación a 37°C y se volvió a determinar su fluorescencia por el mismo método. Para el análisis de los datos, se determinó la media la diferencia de las dos lecturas (delta de fluorescencia) de los duplicados de cada muestra. El valor de cada delta de fluorescencia de

las muestras con partícula fagocitable fue normalizado a la respectiva muestra sin partícula; mientras que el valor de la media de la delta de la muestra de células incubadas con *E.coli* fue normalizado respecto a la muestra de células sin recubrimiento de fragmentos Fab y sin eritrocitos.

5.8. Activación de CD11b inducida por el entrecruzamiento de CD13 con los fragmentos Fab452, FabC o FabE

hMDM fueron recubiertos con los fragmentos anti-CD13, (anti-Fc γ RI), o e mAb IV.3 (anti Fc γ RII), o sin anticuerpo primario, como se indica en el apartado 5.4. Posteriormente, las células se lavaron y se incubaron con fragmentos F(ab) $'$ 2 de IgG de ratón por 30min a 4°C. A una muestra sin anticuerpo primario tampoco se agregó anticuerpo secundario. Seguidamente, las células fueron incubadas por 10 min a 37°C (tiempo de estimulación). La reacción se detuvo fijando a las células con PBS-PFA a 1.5%, por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron y se incubaron por 45min a 4°C con el anticuerpo CBRM1/5 acoplado a PE, el cual reconoce a la conformación activada de la integrina. Después, las células se lavaron y se analizaron por citometría de flujo en el equipo FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA). El análisis de los resultados se realizó normalizando la media de fluorescencia de las muestras experimentales y controles a la muestra NoFab y sin anticuerpo secundario.

6. RESULTADOS

6.1 Generación de fragmentos Fab a partir de los anticuerpos 452, C y E, específicos para CD13.

Debido a que la expresión de receptores Fcγ es ineludible en las células que empleamos en nuestro modelo de estudio, y que como ligandos de CD13 contamos con anticuerpos, en todo los experimentos de este trabajo se usaron fragmentos Fab de los anticuerpos monoclonales (mAb) murinos 452, C y E, para evitar la influencia que los receptores Fcγ pudieran tener a través de su posible interacción con la porción Fc de los anticuerpos anti-CD13.

Para la obtención de los anticuerpos, recuperamos el sobrenadante de los hibridomas 452, C y E, purificamos los anticuerpos a través de columnas de afinidad de proteínas A- y G- agarosa y realizamos la digestión enzimática de los anticuerpos. La elección de la enzima se hizo de acuerdo al isotipo de inmunoglobulina de cada mAb anti-CD13. La fragmentación de los mAb 452 y C, que son del isotipo IgG1, se realizó con ficina; mientras que para la fragmentación del mAbE, que es del isotipo IgG2b, empleamos papaína. En la fragmentación de anticuerpos con estas enzimas, se obtienen dos fragmentos idénticos que contienen las regiones de unión al antígeno, Fab (por su siglas de inglés), además del fragmento cristizable del anticuerpo (Fc).

Después de la fragmentación, se realizó la purificación de los fragmentos Fab por columnas de afinidad de proteínas A y G-agarosa, para retener en ellas la porción Fc de la digestión del anticuerpo, así como el anticuerpo que no hubiera sido digerido. La pureza se verificó en geles de SDS-poliacrilamida, bajo condiciones reductoras y no reductoras. El análisis de las muestras en los geles de SDS-poliacrilamida nos permitió definir la obtención de fracciones puras de Fab de los tres anticuerpos anti-CD13. En la Figura 6.1A se muestra el corrimiento en geles de poliacrilamida en condiciones no reductoras, de las fracciones purificadas tras el fraccionamiento del mAb452. En la Figura 6.1B se muestran las mismas muestras pero en condiciones reductoras. En los carriles 4-7 de la Figura 6.1A, correspondientes a fracciones purificadas de Fabs, se observan bandas de peso aproximado

de 50 kDa en condiciones no reductoras, que corresponden al peso molecular de los Fab o Fc , cuyo peso se descompone en una banda de 25 kDa aproximadamente en condiciones reductoras, como se muestra en la Figura 6.1B. Este hecho confirma que las bandas que observamos corresponden a los Fab, las cuales están constituidos por una cadena ligera de la inmunoglobulina y una porción de la cadena pesada, cada una de un peso molecular de 25kDa, unidas por un puente disulfuro, que se disocia al ser expuesto a condiciones reductoras. Resultados similares fueron encontrados después de la fragmentación de los mAb C y E. En la Figura 6.2, se observan muestras de la purificación de los FabC y FabE. En la Figura 6.2A se muestra el corrimiento en geles de poliacrilamida, de fracciones de la purificación de los fragmentos Fab de los mAbs C y E en condiciones no reductoras, mientras que en la Figura 6.2B, las mismas pero en condiciones reductoras. En los carriles 4-7 se corrieron muestras de la purificación de los FabC, y en los carriles 11-14, fracciones de la purificación de los FabE. En ambos casos es posible observar una serie de bandas de peso aproximado de 50 kDa, y que tras ser expuestas a condiciones reductoras (Figura 6.2B), estas bandas se descomponen en una, de un peso aproximado de 25kDa, lo que confirma que las bandas observadas son Fab y no fragmentos Fc. Después de fragmentar los distintos anticuerpos anti-CD13 y corroborar su pureza, los utilizamos en los distintos ensayos de este proyecto.

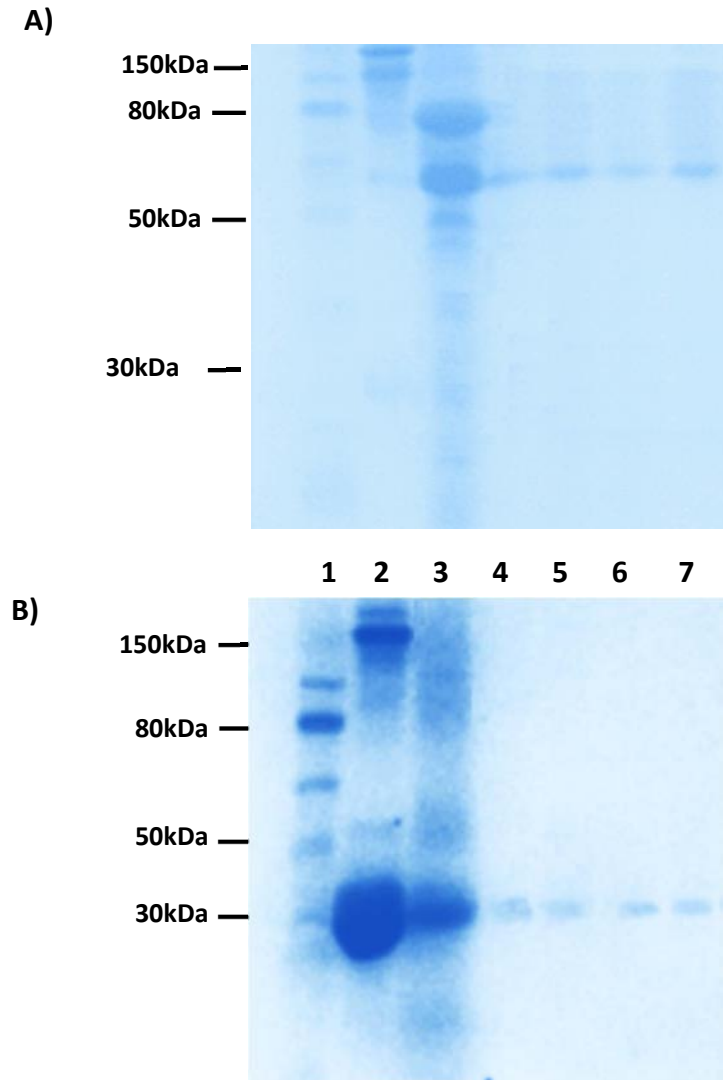
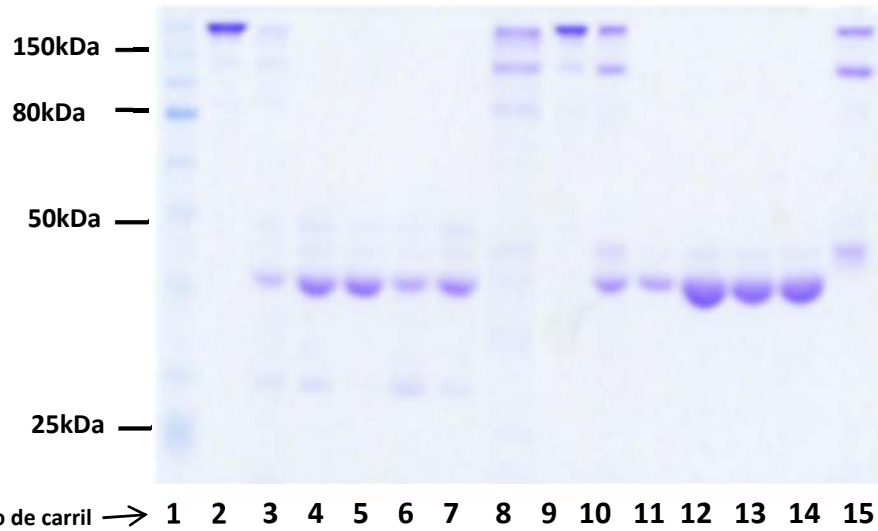


Figura 6.1. Verificación de la pureza de Fabs 452. Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10%, en **A)** condiciones no reductoras y **B)** reductoras. **Carril 1.** Marcador de peso molecular. **Carril 2.** mAb 452 entero. **Carril 3.** mAb 452 fragmentado sin pasar por columna de afinidad. **Carril es 4-6.** Fracciones de Fab452 purificadas por columna de afinidad

A)



B)

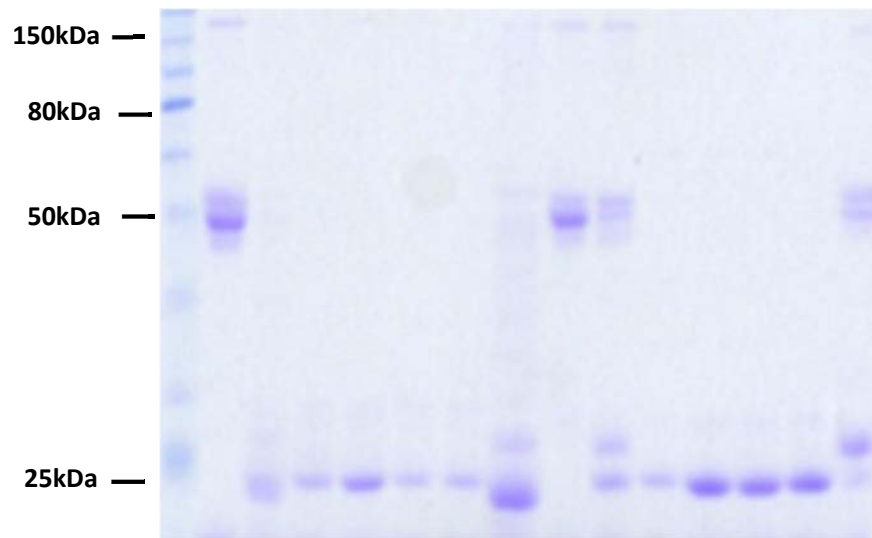


Figura 6.2. Verificación de la pureza de Fabs C y E. Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10%, en A) condiciones no reductoras y B) reductoras. **Carril 1.** Marcador de peso molecular. **Carril 2.** mAb C entero. **Carril 3.** mAb C fragmentado sin pasar por columna de afinidad. **Carriles 4-6.** Fracciones de FabC purificadas por columna de afinidad. **Carril 7.** Elución de columna de afinidad de mAb C fragmentado. **Carril 8.** mAb E entero. **Carril 9.** mAb E fragmentado sin pasar por columna de afinidad. **Carriles 11-14.** Fracciones de FabE purificadas por columna de afinidad. **Carril 15.** Elución de columna de afinidad mAb E fragmentado.

6.2. Los fragmentos FabC y FabE son capaces de inducir fagocitosis mediada por CD13 en células THP-1.

Primeramente evaluamos si los fragmentos FabC y FabE, al igual que los Fab452, poseen la capacidad de inducir fagocitosis mediada por CD13 en la línea celular monocítica THP-1. Debido a que la expresión de receptores fagocíticos en la membrana celular de estas células es diversa, hicimos uso de una metodología que permite dirigir a la partícula a fagocitar hacia un receptor en específico, denominada por esta razón “fagocitosis selectiva”.

Para ello, eritrocitos de carnero teñidos con CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester), fueron recubiertos consecutivamente con biotina, estreptavidina y finalmente con fragmentos F(ab)² biotinilados de anticuerpos de cabra anti-Ig de ratón (F(ab)²CαR). A estos eritrocitos les denominamos EBS-Fab. Por otro lado, las células fagocíticas fueron recubiertas con fragmentos Fab de ratón específicos para el receptor de interés. De esta forma, los F(ab)²CαR unidos al eritrocito son capaces de entrecruzar al receptor blanco en la superficie de la célula fagocítica, mediante el reconocimiento de los fragmentos Fab de ratón que se han unido previamente al el receptor blanco para el que son específicos. En los ensayos de fagocitosis, las células fueron incubadas con distintas concentraciones (2μg, 0.2μg y 0.02μg de Fab/250μL de medio/ millón de células) de fragmentos Fab anti-CD13 (Fab452, FabC o FabE); o con fragmentos de Fab anti-FcγRI (Fab 32.2, 4μg/250μL/millón de células); o sin fragmentos (denominado No Fab). La evaluación de la fagocitosis se realizó por citometría de flujo utilizando azul de tripano para apagar la fluorescencia externa. Los parámetros de evaluación que se determinaron fueron el porcentaje de células que fagocitaron, es decir las células CFSE positivas (células que hubieran internalizado al menos un eritrocito, Figura 6.3C).

En la Figura 6.3A se muestran las medias del porcentaje de internalización obtenidas con los distintos Fab anti-CD13 a las diferentes concentraciones del anticuerpo empleadas. Como control positivo del experimento, se evaluó la fagocitosis selectiva a través del receptor FcγRI (media 65.28 %) empleando fragmentos Fab32.2 y como control negativo se evaluó la fagocitosis basal de la muestra NoFab. Encontramos que, a las concentraciones de

2 y 0.2 μ g de Fab, los tres Fab anti-CD13 indujeron la internalización de los EBS-Fabs, y esta tuvo una diferencia estadísticamente significativa respecto al control negativo (No Fab, media 5.28%). La media de los porcentajes obtenidos a la concentración de 2 μ g fue de 30.45% para el Fab452, 24.81% para el FabC, y 23.21 % para el FabE; mientras que para la concentración de 0.2 μ g, la media de porcentaje fue de 27.95%, 20.41% y 19.22% para los Fab452, FabC y FabE, respectivamente. A la concentración de 0.02 μ g, la media del porcentaje de internalización fue del 17.97% para el Fab452, y del 17.75% y 15.2% para los FabC y FabE, respectivamente. Al realizar la comparación de este último grupo de porcentajes con el de la muestra control, no encontramos diferencias estadísticamente significativas. Los porcentajes obtenidos con los FabC y FabE a la concentración de 2 μ g (24.81 % y 23.21 %, respectivamente) y a 0.2 μ g (20.41% y 19.22%, respectivamente), son inferiores a los porcentajes obtenidos con el Fab452 (30.45% a 2 μ g, y de 27.95% a 0.2 μ g); sin embargo, cuando realizamos la comparación entre estos porcentajes no se encontraron diferencias significativas. En la Figura 6.3C se muestran gráficas de punto representativas de estos experimentos.

Otro parámetro de evaluación de la fagocitosis fue el índice fagocítico (IF), el cual lo determinamos como el producto del porcentaje de fagocitosis por la intensidad media de fluorescencia. Después normalizamos los valores obtenidos respecto a la muestra NoFab. Como control positivo evaluamos la media del IF relativo de la fagocitosis a través de los Fc γ RI, cuyo valor fue 79.8. Las medias obtenidas del IF normalizado para las muestras recubiertas con 2, 0.2 y 0.2 μ g del Fab452 fueron 19.85, 16.97 y 13.64, respectivamente; para las muestras recubiertas con 2, 0.2 y 0.2 μ g del FabC, fueron 13.07, 9.26 y 9.34. Mientras que para las muestras recubiertas con 0.2 y 0.2 μ g del FabE, las medias de IF fagocítico fueron 11.91, 11.59 y 6.22, respectivamente. La comparación entre las medias del IF de las muestras recubiertas con Fab452, FabC o FabE, a las tres cantidades de Fab empleadas, no evidenció alguna diferencia significativa. Sin embargo, la comparación de las medias del IF relativo de las distintas muestras respecto a la NoFab, evidenció una diferencia significativa únicamente para las muestras Fab452 2 μ g, FabC 2 μ g, FabE 2 μ g, Fab452 0,2 μ g, Fab452 0.02 μ g y FabC 0.02 μ g (Figura 6.3B).

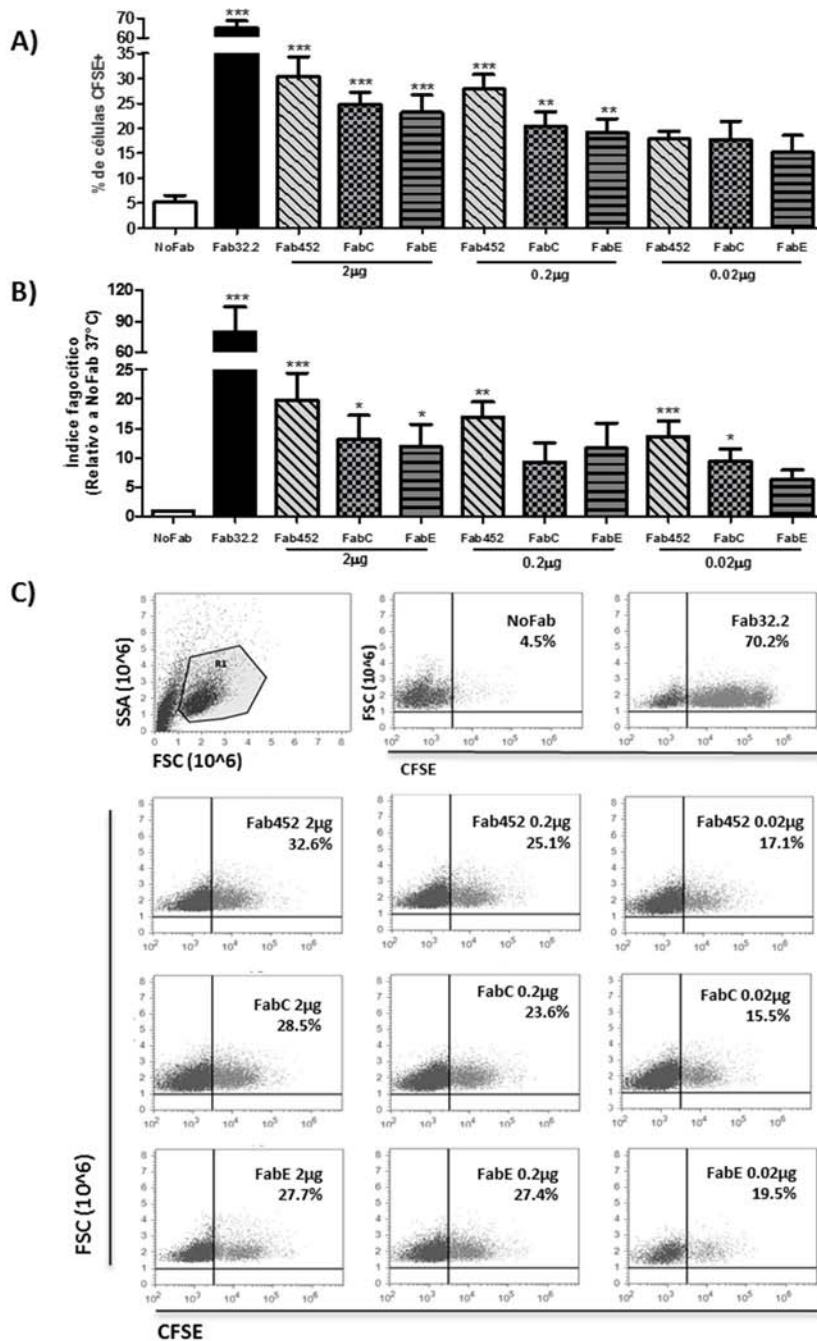


Figura 6.3. Los Fab452, FabC y FabE son capaces de mediar la fagocitosis en células THP-1. Células THP-1 fueron incubadas con diferentes concentraciones, 2μg, 0.2μg y 0.02μg de Fab452, FabC ó FabE; 4μg de Fab32.2 o sin fragmentos (No Fab) por 30 min a 4°C, se lavaron y se incubaron con los EBS-Fabs por 105min a 37°C y muestras paralelas como control, a 4°C. Los EBS-Fabs no internalizados fueron lisados por choque hipotónico. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo en presencia de azul tripano para apagar la fluorescencia extracelular. A) Promedio de células CFSE positivas de 5 experimentos independientes. B) Promedio del índice fagocítico relativo a la muestra NoFab a 37°C, de cinco experimentos independientes. C) Gráficas de punto representativas de un experimento a 37°C. ANOVA de un vía, seguida de prueba de Tukey. ***p<0.0001, **p<0.005, *p<0.05.

Debido a que utilizamos varias concentraciones de Fabs con diferencias logarítmicas para recubrir a las células fagocíticas y dado que la interacción de la partícula fagocítica con la célula está dada por la unión de dichos Fabs a los receptores de interés, nos dimos a la tarea de evaluar por citometría de flujo el recubrimiento de las células por los Fabs a las concentraciones utilizadas. Para este fin, analizamos la intensidad media de fluorescencia de células recubiertas con diferentes concentraciones (2, 0.2 y 0.02 μ g de Fab/250 μ L medio/millón de células) de los Fab anti-CD13 (Fab452, FabC o FabE), teñidas con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón acoplado a FITC (Figura 6.3A). Al comparar los diferentes tratamientos de concentración y tipo de Fab respecto a la muestra sin recubrimiento (NoFab), encontramos una diferencia significativa de la unión de los Fab452, FabC y FabE a las concentraciones de 2 y 0.2 μ g respecto a la muestra NoFab. Mientras que la diferencia en la IMF de las muestras recubiertas con 0.02 μ g de Fab452, FabC o FabE; a pesar de ser mayor a la observada en las muestras NoFab, no es significativa. Por otro lado, al comparar la unión de los FabC y FabE respecto a la del Fab452, encontramos que no hay diferencias significativas en las tres concentraciones de fragmentos Fab empleadas. Es decir, que medida de esta manera, los tres fragmentos anti-CD13 se unen de una forma cuantitativa similar a CD13. Finalmente, al comparar la unión de los fragmentos Fab anti-CD13 entre las diferentes concentraciones, encontramos que la unión de los Fab anti-CD13 a la concentración de 2 μ g es estadísticamente significativa respecto a las muestras recubiertas con 0.2 μ g ó 0.02 μ g. Asimismo, la comparación de la unión de los Fab a la concentración de 0.2 μ g es significativamente diferente a la unión de los Fab a la concentración de 0.02 μ g. En la Figura 6.3B se muestra un conjunto de histogramas representativos de la unión de los distintos Fabs a las células THP-1.

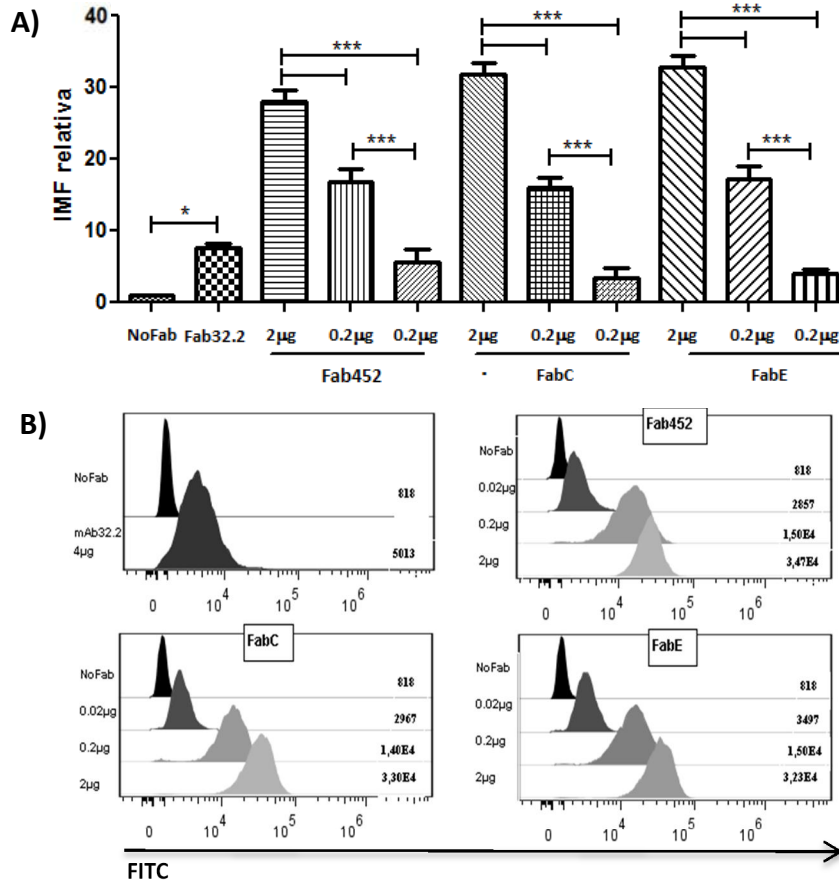


Figura 6.3. Unión de los Fab452, FabC y FabE a diferentes concentraciones a células THP-1. Una muestra de las células que fueron recubiertas para los ensayos fagocíticos con 2, 0.2 o 0.02 μg de Fab452, FabC o FabE; 4 μg de Fab32.2, fue lavada y teñida con un anticuerpo de cabra anti ratón acoplado a FITC. Posteriormente, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. La intensidad media de fluorescencia (IMF) fue normalizada respecto al No Fab. A) Medias de la IMF relativa a la muestra NoFab de 5 experimentos independientes. B) Histogramas representativos de un experimento de la unión de los Fab a las células. ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey. ***p<0.0001, **p<0.005, *p<0.05.

Los datos obtenidos en los porcentajes de fagocitosis, que indican la cantidad de células que internalizaron partículas, muestran que los FabC y FabE, también son capaces de inducir la fagocitosis mediada por CD13, como fue reportado previamente por nuestro grupo para el Fab452. A pesar de que los índices fagocíticos obtenidos con los FabC y FabE fueron menores a los obtenidos con el Fab452 no mostraron diferencias significativas con respecto al control NoFab, sí se observa una tendencia positiva en este parámetro. Es importante subrayar que, debido al tamaño de la partícula fagocitable ($\geq 4 \mu\text{m}$) empleada en estos ensayos, es posible descartar mecanismos de internalización diferentes a la fagocitosis en el proceso mediado por los Fab452, FabC o FabE.

6.3. Los fragmentos FabC y FabE también son capaces de inducir fagocitosis mediada por CD13 en hMDM.

Con la finalidad de investigar si la internalización de partículas a través de CD13 mediada por los FabC y FabE constituye un fenómeno particular de la línea celular THP-1 o puede ser categorizado como un fenómeno general de células fagocíticas, realizamos experimentos de fagocitosis selectiva con estos fragmentos y el Fab452 en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica de humano (hMDM). Estas células ofrecen también la ventaja de poseer una mayor capacidad fagocítica, que puede permitir determinar si existen diferencias significativas o no en el IF obtenido con los diferentes Fab anti-CD13.

En la determinación del porcentaje de fagocitosis, encontramos que con las tres concentraciones empleadas de los Fabs anti-CD13 fue posible inducir una fagocitosis estadísticamente significativa mediada por CD13 respecto a la observada con las células sin recubrimiento, y que los valores obtenidos de los porcentajes de células fagocíticas con los FabC y FabE fueron similares a los observados con el Fab452 (Figura 6.6A). La media de porcentaje de células positivas obtenida a la concentración de 2 μ g de Fab, fue de 36.97%, 34.55% y 33.5% para los Fab452, FabC y FabE; a la concentración de 0.2 μ g, fue de 34.55%, 34.89% y 29.17%, respectivamente; y para la concentración de 0.02 μ g fue de 33.50% para el Fab452, de 32.76% para el FabC y finalmente de 27.81% para el FabE. Los porcentajes obtenidos en el grupo de 2 μ g fueron muy parecidos a los obtenidos en el grupo de 0.2 μ g con los tres Fab anti-CD13; los porcentajes de fagocitosis del grupo de 0.02 μ g fueron ligeramente menores. El análisis estadístico evidenció que las diferencias en las medias de porcentaje de células fagocíticas de las muestras con las diferentes concentraciones y los diferentes Fabs empleados, no son estadísticamente significativas.

En cuanto al IF, a diferencia de las células THP-1, sí observamos diferencias significativas en las dos concentraciones mayores de Fab con los tres Fab anti-CD13 en comparación con la muestra control (NoFab). En cuanto a la concentración de 0.02 μ g, los valores de la media del IF, a pesar de ser mayores al de la muestra control NoFab, no fueron significativamente diferentes para los tres Fab-antiCD13. La media de IF normalizado obtenida fue de 8.9 para los Fab32.2, mientras que para la concentración de 2 μ g, la media

del IF para el Fab452, FabC y FabE fue de 3.5, 2.88 y 3.4, respectivamente; para la concentración de 0.2 fue de 2.7, 3.58, y 3.5, respectivamente. Finalmente, las medias de IF para la concentración de 0.02 μ g para el Fab452 fue de 3.5, para el FabC 2.04, y para el FabE fue de 2.35.

En la evaluación del recubrimiento de los hMDM con diferentes concentraciones de Fab, encontramos resultados similares a los de las células THP-1, es decir, las células incubadas con una mayor concentración de Fab anti-CD13, mostraron una mayor unión de Fab, que decreció significativamente conforme disminuía la cantidad de Fab empleado. A todas las concentraciones de Fab utilizadas, se observó una unión similar entre los FabC, FabE, y Fab452. En todas las concentraciones de Fabs 452, Fab C y Fab E usadas, fue posible observar fagocitosis significativamente mayor a la observada en la fagocitosis basal (células control NoFab).

En conjunto, estos datos sugieren que en hMDM, los FabC y FabE son capaces de mediar la fagocitosis a través de CD13 como lo hace el Fab452; y que este fenómeno no se limita a una línea celular particular como la línea THP-1.

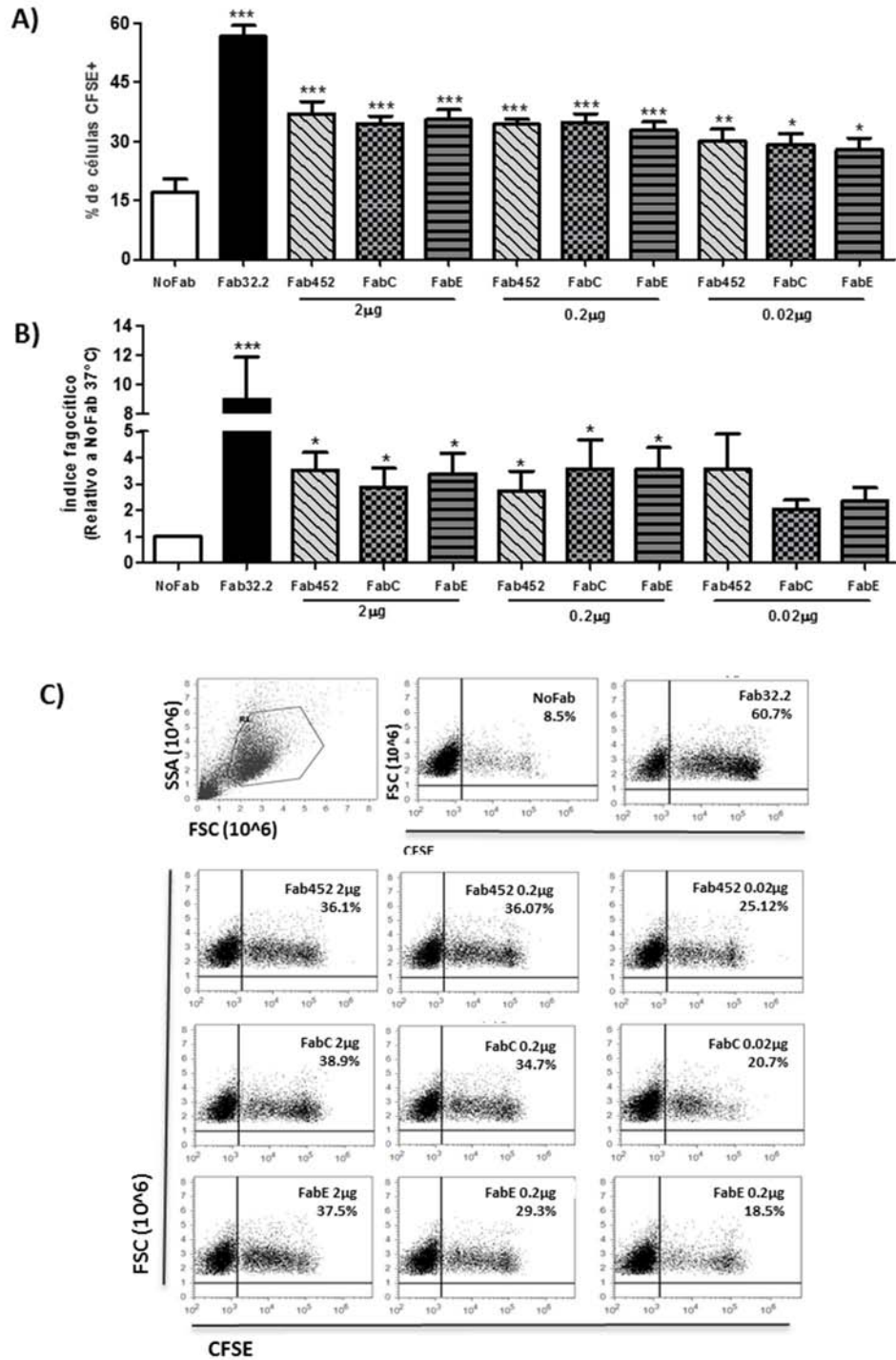


Figura 6.5. Los Fab452, FabC y FabE son capaces de mediar la fagocitosis en células hMDM. hMDM fueron incubados con diferentes concentraciones, 2µg, 0.2µg y 0.02µg de Fab452, FabC ó FabE; 8µg de Fab32.2 o sin fragmentos (No Fab) por 30 min a 4°C, se lavaron y se incubaron con los EBS-Fabs por 45min a 37°C y muestras paralelas como control, a 4°C. Los EBS-Fabs no internalizados fueron lisados por choque hipotónico. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo en presencia de azul tripano para apagar la fluorescencia extracelular. A) Promedio de células CFSE positivas de 5 experimentos independientes. B) Promedio del índice fagocítico relativo a la muestra NoFab a 37°C, de cinco experimentos independientes. C) Gráficas de punto representativas de un experimento a 37°C. ANOVA de un vía, seguida de prueba de Tukey. ***p≤0.0001, **p≤0.005, *p≤0.05.

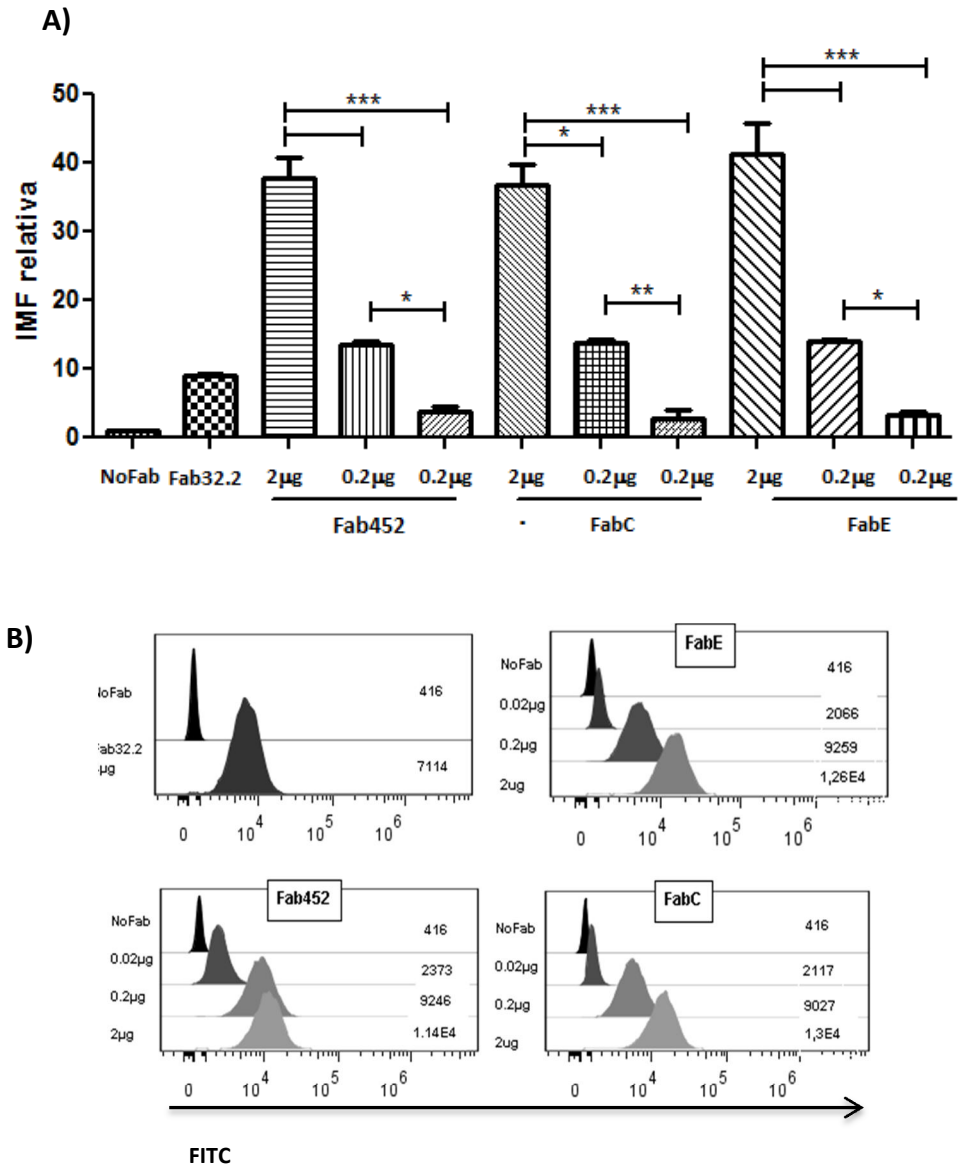


Figura 6.6. Unión de los Fab452, FabC y FabE a diferentes concentraciones a hMDM. Una muestra de las células que fueron recubiertas para los ensayos fagocíticos con 2, 0.2 o 0.02µg de Fab452, FabC o FabE; 4µg de Fab32.2 o sin anticuerpo, las células fueron lavadas y teñidas con un anticuerpo de cabra anti-ratón acoplado a FITC. Posteriormente, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. La intensidad media de fluorescencia (IMF) fue normalizada respecto al No Fab. A) Medias de la IMF relativa a las células sin anticuerpo primario de 5 experimentos independientes. B) Histogramas representativos de un experimento de la unión de los Fab a las células. ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey. *** $p \leq 0.0001$, ** $p \leq 0.005$, * $p \leq 0.05$

6.4. El entrecruzamiento de CD13 por la partícula fagocitable mediada por los Fab452, FabC y FabE induce la fosforilación de Syk en células THP-1.

Una vez determinado que los FabC y FabE también son capaces de inducir la fagocitosis mediada por CD13, quisimos corroborar la activación de vías de señalización relacionadas a la fagocitosis a través de CD13 mediada por los Fab452, C y E. Uno de los eventos primarios en la vía de señalización de la fagocitosis de algunos receptores, es la activación de Syk. Recientemente, nuestro grupo reportó que el empleo del inhibidor farmacológico de Syk, BAY 61.3606, disminuye la fagocitosis mediada por CD13 en células THP-1 y hMDM; y que el entrecruzamiento de CD13 con Fab452 y un anticuerpo secundario soluble, induce la fosforilación de Syk. Debido a esto y a que el propósito de este proyecto es determinar la capacidad de los FabC y FabE para mediar fagocitosis a través de CD13, decidimos evaluar si el entrecruzamiento de CD13 con una partícula fagocitable a través de los Fab452, FabC o FabE, es capaz de inducir fosforilación de Syk. Para estos ensayos, empleamos células THP-1 incubadas con 2µg de Fab452, FabC o FabE; 8µg de Fab32.2 en 250µL de medio/millón de células, o sin anticuerpo. A las células se les retiró el exceso de fragmentos Fabs mediante lavados, y luego fueron incubadas con EBS-Fab por 15min a 4°C. Posteriormente, diferentes muestras fueron colocadas por periodos de 20s, 40s, 1min, 3 y 5min a 37°C, para que procediera la activación. Las células fueron fijadas y permeabilizadas para teñirlas con un anticuerpo anti-fosfo Syk. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo y el análisis estadístico se realizó utilizando la mediana de fluorescencia, tal como ha sido reportado para este tipo de ensayos[67, 68]. Las medianas de las cinéticas para cada Fab y la muestra control NoFab, fueron normalizadas al tiempo 0 min de su respectiva condición.

Los resultados obtenidos indican que el entrecruzamiento de CD13 con partícula fagocítica utilizando los FabC y FabE, al igual que el Fab 452, induce la fosforilación de Syk. El análisis de la cinética de la fosforilación de Syk tras el entrecruzamiento con los distintos fragmentos Fab anti-CD13 con partícula fagocítica, evidenció un pico de fosforilación con los tres Fab anti-CD13 a los 20s, y que el nivel de fosforilación disminuye rápidamente, dado que a partir de los 3min se encuentra nuevamente a niveles basales. La cinética de activación Syk también se determinó tras el entrecruzamiento de FcγRI a través de Fab32.2,

pero a los tiempos estudiados en este ensayo no observamos una fosforilación significativa de Syk(Figura 6.7). Esto concuerda con datos experimentales de nuestro laboratorio, que demuestran que la cinética de activación de Syk por el entrecruzamiento de los Fc γ RI tiene una cinética diferente a la observada tras el entrecruzamiento de CD13. La activación de Syk a través de los Fc γ RI es evidente a partir de los 3 min de estimulación, mientras que a través de CD13 puede ser detectada en lapsos menores de estimulación.

Estos datos sugieren que el entrecruzamiento de CD13 en las células THP-1 con partículas fagocitables a través de los Fab452, FabC o FabE, induce la activación de vías de señalización tempranas relacionadas a la fagocitosis, como lo es la fosforilación de Syk[61, 63].

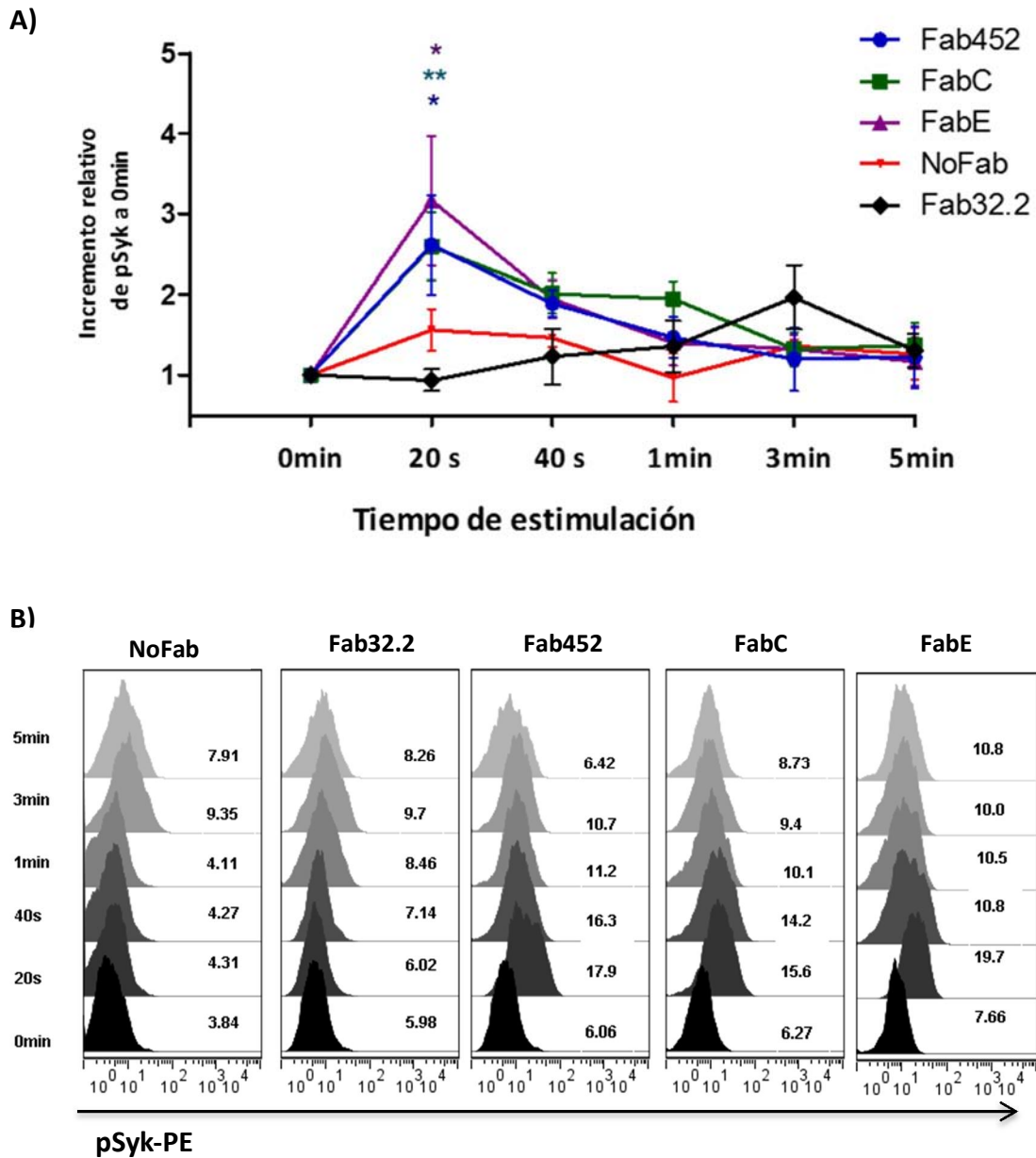


Figura 6.7. Los Fab452, FabC o FabE son capaces de inducir la fosforilación de Syk a través del entrecruzamiento de CD13 con partícula en células THP-1. Células THP-1 fueron incubadas con 2µg de Fab452, FabC ó FabE; ó con 8µg de mAb32.2 ó sin anticuerpo (NoFab) por 30 min a 4°C. Las células fueron lavadas e incubadas por 15min con los EBS-Fabs a 4°C, después fueron incubadas por diferentes periodos a 37°C (tiempo de estimulación). La células se fijaron y permeabilizaron, y posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo anti-Syk conjugado con PE. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. Después se realizó el análisis estadístico de las medianas de fluorescencias normalizadas de cuatro experimentos independientes, al tiempo 0min de cada muestra. A) Cinética de fosforilación de Syk con los diferentes tratamientos. B) Histogramas representativos de un experimento de la fosforilación de Syk. ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Tukey para cada muestra. **p≤0.005, *p≤0.05.

6.5. El entrecruzamiento de CD13 a través de los Fab452, FabC y FabE con partícula fagocitable induce la fosforilación de Syk en hMDM

La cinética de activación de Syk también fue evaluada en hMDM. En estas células, los resultados mostraron que el entrecruzamiento de CD13 con los FabC y FabE, al igual que el Fab452, es capaz de inducir la fosforilación de Syk. A partir de los 20s después del entrecruzamiento de CD13 con los Fab452 o FabE, es posible observar la fosforilación significativa de Syk. La fosforilación de Syk alcanza un máximo a los 40s, tras estimular con cualquiera de los tres Fab anti-CD13. La fosforilación significativa de Syk fue posible observarla aun a 1min de estimulación con los Fab452 y FabE. Posteriormente disminuyó hasta llegar a niveles casi basales a partir de los 3 min. A pesar de que no se observó una activación significativa de Syk tras el entrecruzamiento de CD13 con el FabC a los 20s y 1min de estimulación, los valores obtenidos se encuentran cercanos a ser significativos (Figura 6.8A). En la Figura 6.8B se muestran los histogramas de un experimento representativo de la fosforilación de Syk tras el entrecruzamiento de CD13 con los Fab452, FabC y FabE.

En conjunto, estos datos permiten corroborar que los Fab452, FabC y FabE son capaces de inducir la fosforilación de Syk tras el entrecruzamiento de CD13 con partícula fagocitable en hMDM.

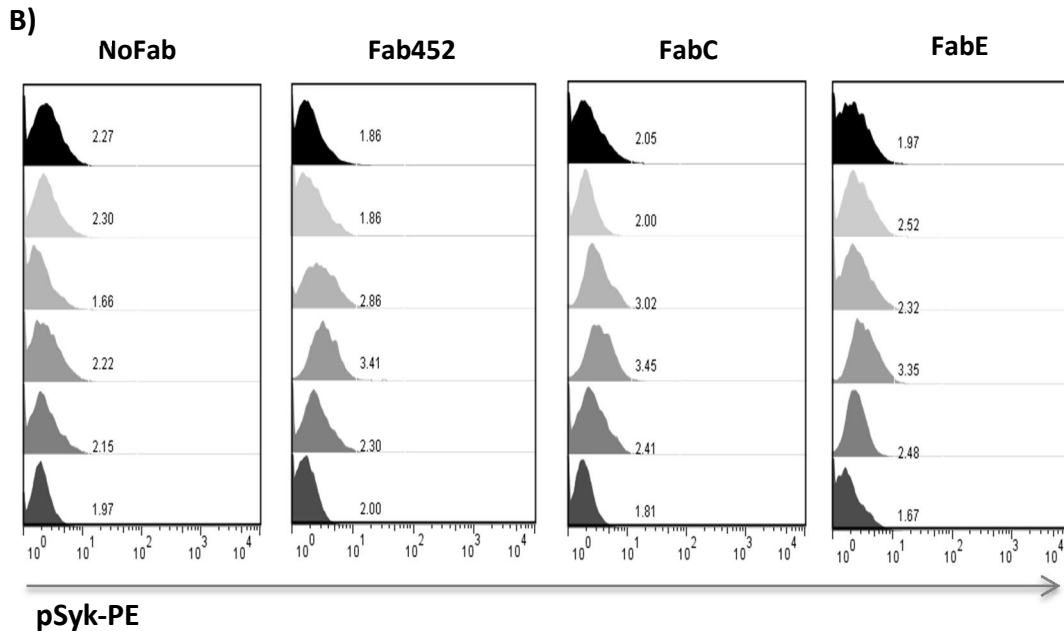
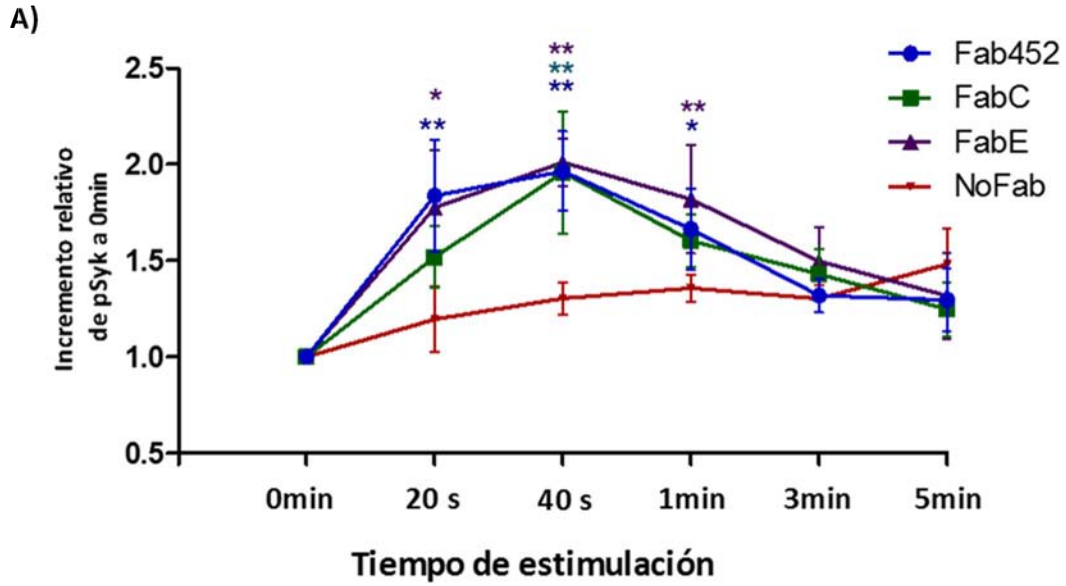


Figura6.8. Los Fab452, FabC o FabE son capaces de inducir la fosforilación de Syk a través del entrecruzamiento de CD13 con partícula en hMDM. hMDM fueron incubados con 2µg de Fab452, FabC o FabE; u 8µg de mAb32.2 o sin anticuerpo (NoFab) por 30 min a 4°C. Las células fueron lavadas e incubadas por 15min con los EBS-Fabs a 4°C , después fueron incubadas por diferentes periodos a 37°C (tiempo de estimulación). La células se fijaron y permeabilizaron, y posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo anti-fosfoSyk conjugado con PE. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. Después se realizó el análisis estadístico de las medianas de fluorescencias de cuatro experimentos independientes, normalizadas al tiempo 0min de cada muestra. A) Cinética de fosforilación de Syk con los diferentes tratamientos. B) Histogramas representativos de un experimento de la fosforilación de Syk. ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Tukey. **p≤0.005, *p≤0.05.

6.6. La fagocitosis a través de CD13, mediada por los Fab452, FabC y FabE induce la producción de ROS en hMDM-M1

Una de las características de los fagosomas de los fagocitos profesionales es que poseen un arsenal de agentes antimicrobianos que matan y degradan los microorganismos internalizados. Entre estos agentes están proteínas y péptidos antimicrobianos, pH bajo, enzimas hidrolíticas y moléculas especializadas que median el ataque oxidativo: las especies reactivas de oxígeno. Debido a que todos estos procesos requieren de la fusión secuencial del fagosoma recién formado con diferentes vesículas intracelulares, es decir, de la maduración del fagosoma, es correcto denominar que la producción de ROS puede ser una consecuencia tardía de la fagocitosis. La producción de ROS ha sido reportada en neutrófilos, células dendríticas y macrófagos, pero en este último grupo, la producción de ROS ha sido relacionada mayoritariamente a aquella población de macrófagos polarizada al estadio inflamatorio M1. Recientemente, nuestro grupo de investigación reportó que el entrecruzamiento de CD13 humano con los Fab452 y un anticuerpo secundario, en células murinas tipo macrófagos infectadas con un sistema lentiviral para expresar el CD13 humano, indujo la producción de ROS[63]. Después de corroborar la participación de los FabC y Fab E, como el Fab452, en la fagocitosis de partículas grandes y en eventos tempranos de señalización, decidimos evaluar su influencia en funciones tardías relacionadas a la fagocitosis, como la producción de ROS en hMDM en el estadio M0 y en macrófagos polarizados al estadio inflamatorio M1.

Para la realización de estos ensayos, hMDM fueron incubados o no con IFN- γ (30 ng/mL) por 48 hrs, para obtener macrófagos en estadio M1 o M0, respectivamente. La determinación de la expresión de CD13 y Fc γ RI en los hMDM M1 y M0 muestra que la expresión de CD13 se mantiene constante en ambas poblaciones de hMDM; mientras que la expresión de Fc γ R1 incrementa tras la polarización de los hMDM al estadio M1 (Figura Suplementaria 1). Los macrófagos M0 y M1 fueron tratados con 2 μ g de Fab 452, FabC o FabE; 8 μ g de Fab32.2 o sin anticuerpo (NoFab); posteriormente se incubaron dos muestras de cada condición por 30min a 37° min, una de ellas en presencia de los EBS-Fab para inducir el entrecruzamiento de la molécula de interés. Como otro control positivo de producción

de ROS, se incubó una muestra de macrófagos sin Fab con *E. coli* inactivadas por calor. Al término de los 30 min de incubación, se realizó una lectura de la producción de ROS. Las ROS fueron detectados fluorométricamente usando Carboxy-H₂DFFDA que emite fluorescencia en presencia de ROS. Las células permanecieron 1h más en incubación a 37°C y se midió de nuevo la producción de ROS. Con estos datos, fue calculada la diferencia de producción de ROS, y se determinó si hubo un aumento en la producción de ROS en presencia de la partícula fagocitable. Por ejemplo, la diferencia de la muestra recubierta con Fab452 fue comparada con aquella que además de estar recubiertas con Fab452, fue incubada en presencia de los EBS-Fab.

Los resultados obtenidos con los hMDM M0 indican que la fagocitosis mediada por CD13 a través de cualquier Fab anti-CD13 no induce la producción de ROS respecto a su muestra paralela sin partícula fagocitable. Importantemente, el entrecruzamiento de los Fc γ RI con el Fab32.2 o la incubación de los hMDM M0 con *E.coli* inactivadas por calor, tampoco indujo la producción significativa de ROS, reflejando que esta población no induce niveles significativos de ROS tras diferentes estímulos (Figura 6.9A). En contraste, el análisis de los resultados obtenidos en los hMDM M1, evidenció un incremento significativo en la producción de ROS en la fagocitosis mediada por los Fc γ RI o de *E.coli* inactivada. Y en cuanto a la fagocitosis mediada por CD13 con los Fab452, C y E, se observó que también indujo la producción significativa de ROS. El incremento observado en la producción de ROS por la fagocitosis de partículas, tuvo niveles similares con los tres Fab anti-CD13. Es importante señalar que células sin recubrimiento e incubadas con EBS-Fab también mostraron un incremento en la producción de ROS con respecto a las células sin recubrimiento y sin EBS-Fab, pero éste no fue significativo (Figura 6.9B).

Estos datos indican que la fagocitosis mediada por CD13, a través los Fab452, FabE o FabC, induce los mismos efectos en eventos tardíos relacionados a la fagocitosis, como la producción significativa de ROS en hMDM M1.

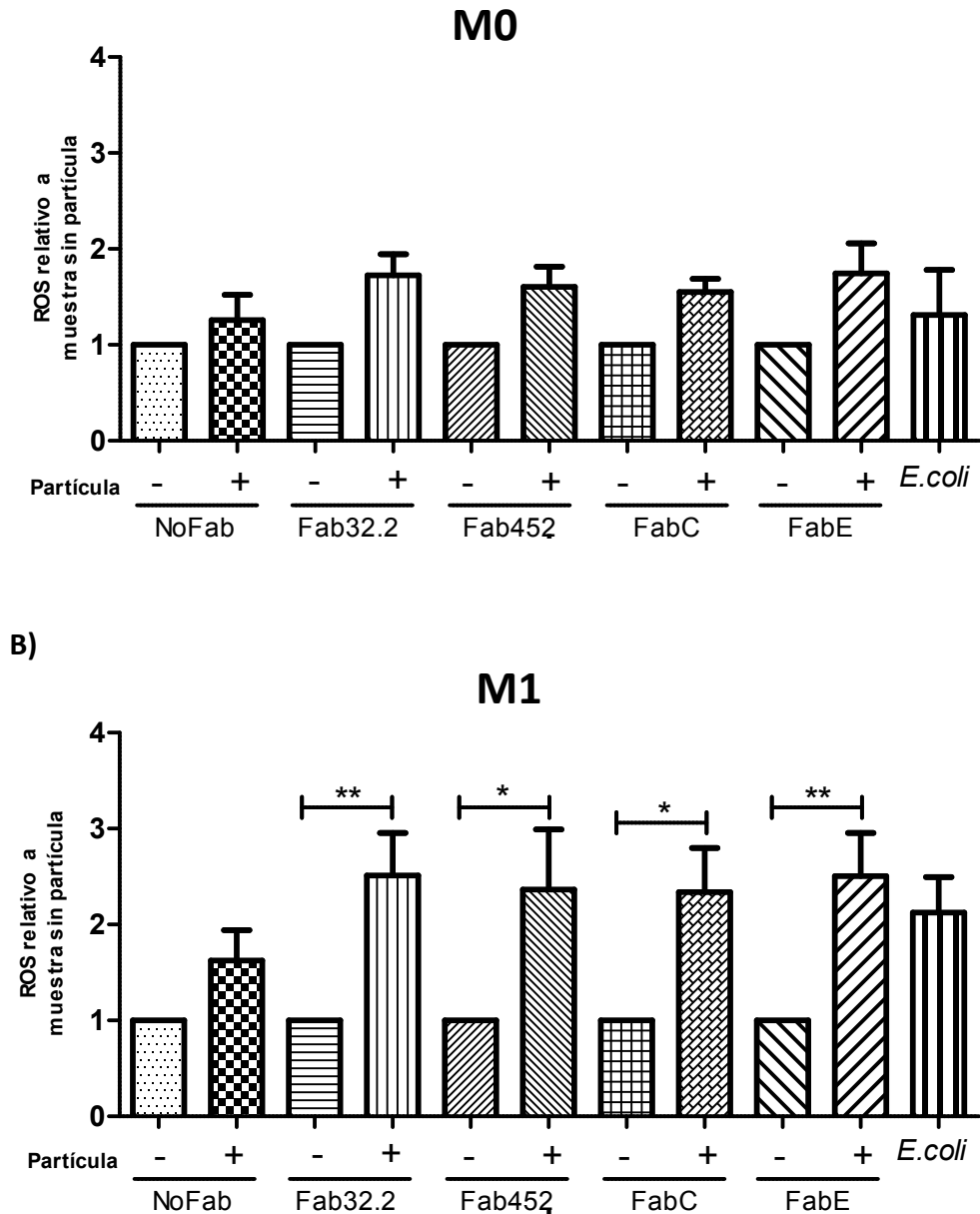


Figura 6.9. Los Fab452, FabC o FabE son capaces de inducir la producción de ROS a través del entrecruzamiento de CD13 con partícula hMDM polarizados a M1. hMDM fueron polarizados macrófagos M1 por el tratamiento con IFN- γ (30ng/mL) por 48 hrs, o mantenidos en estadio M0. Al término de la polarización, los hMDM M1 o M0 fueron incubados con 2 μ g de Fab452, FabC o FabE por 30min a 4°C. Las células fueron lavadas e incubadas con los EBS-Fabs por 30min a 37° y se cuantificó la producción de ROS fluorimetricamente. Las células fueron incubadas por 1h más a 37° monitoreando la producción de ROS. Posteriormente, fue calculada la delta de las dos mediciones de seis experimentos independientes, y fueron normalizadas a la respectiva muestra paralela sin partícula. Incremento relativo de la producción de ROS en A)hMDM M0, y B) hMDM M1. ANOVA de una vía, seguida de Bonferroni. ** $p \leq 0.005$, * $p \leq 0.05$

6.7. El entrecruzamiento de CD13 con Fab452, FabC y FabE induce la activación de CR3.

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, ha sido demostrado que la agregación de CD13 con el Fab 452 regula positivamente la fagocitosis a través de los receptores Fc γ RI y de otros receptores innatos, y que probablemente sea a través de la inducción de vías de señalización compartidas entre estos receptores. Así mismo, fue demostrado que el entrecruzamiento de CD13 con el Fab452 induce la activación de CR3. Debido a que estos procesos requieren de vías de señalización, nos preguntamos si el entrecruzamiento de CD13 con los FabC y Fab E también induce la activación de CR3.

Para estos experimentos, se estimularon hMDM por agregación de CD13 con los Fab452, FabC o FabE más un anticuerpo secundario; o por agregación del Fc γ RI con Fab32.2 como control negativo; o por agregación del Fc γ RII con el mAb IV.3, como control positivo; por 10 min a 37°C. El estado de activación de CR3 fue detectado con el anticuerpo CBRM1/5 conjugado con PE, que reconoce un epítopo expuesto luego del cambio conformacional de activación. Posteriormente las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. El análisis reveló que el entrecruzamiento de CD13 con los Fab452, FabC o FabE, indujo un aumento significativo en el estado de activación de CR3, en comparación con las células sin tratamiento, o en las células en las que se entrecruzo el Fc γ RI (Figura 6.10B). El entrecruzamiento de Fc γ RII también indujo un aumento significativo en la activación de CR3, como previamente ha sido reportado. En la Figura 6.10A se muestra un conjunto de histogramas de un experimento representativo de la activación de CR3 por el entrecruzamiento de CD13 con los Fab452, FabC o FabE.

Estos datos indican que la agregación de CD13 con los Fab452, FabC o FabE induce la activación de CR3. Esto sugiere otros procesos en los que CD13 estaría participando y que requieren de la activación de vías de señalización intracelular, pueden ser mediados tras su entrecruzamiento con los Fab452, FabC o FabE, como lo es la activación de CR3.

7. DISCUSIÓN

CD13 es una exopeptidasa que escinde preferencialmente aminoácidos neutros del extremo amino terminal de una gran variedad de sustratos [41, 43, 46]. Por otro lado, se ha evidenciado que la participación de CD13 en una gran variedad de procesos biológicos ocurre independientemente de su actividad enzimática; así que, tras la unión de un ligando o un sustrato, CD13 puede funcionar como una enzima o un receptor membranal [42]. Al respecto de estas dos últimas funciones, trabajos de nuestro laboratorio ([57, 65] (Claudia Garay y colaboradores, datos no publicados) y de otros grupos [58, 59, 66, 69], han señalado la participación de CD13 en la agregación celular homotípica y heterotípica, así como su participación como molécula moduladora positiva de la fagocitosis a través de los Fc γ RI y otros receptores de reconocimiento innato [61, 62]. Además, recientemente nuestro equipo reportó a CD13 como un receptor fagocítico primario [63].

La caracterización de la participación de CD13 en agregación celular, ha sido hecha mayoritariamente con anticuerpos monoclonales y se ha observado que existen diferencias en los efectos que ejercen diferentes anticuerpos sobre las funciones en las que CD13 ha sido relacionado ([57, 59, 66, 70] (Claudia Garay y colaboradores, datos no publicados), como se explica más adelante. El estudio de estas diferencias puede permitirnos entender mejor los mecanismos moleculares a través de los cuales CD13 participa en los distintos procesos biológicos en los que ha sido involucrado, como en la misma agregación celular o la fagocitosis. En lo que se refiere a la agregación celular inducida por CD13, en la etapa inicial de su estudio se emplearon algunos anticuerpos que poseen la capacidad de inhibir la actividad enzimática de CD13, como los mAbs WM15 y MY7, mientras que otros anticuerpos no, como el mAb452 y el SJ1D1, pero que en ambos casos son capaces de inducir la activación de señalización intracelular y agregación celular, por lo que han sido denominados “anticuerpos activadores”. Mientras que el empleo de otro anticuerpo, el mAb WM4.7, no ejerce efecto alguno sobre la agregación celular mediada por CD13[57]. Posteriormente, durante el estudio de la agregación celular inducida por el entrecruzamiento de CD13, en nuestro laboratorio se produjeron dos anticuerpos monoclonales anti-CD13, denominados el mAbC y el mAbE (Claudia Garay y colaboradores,

datos no publicados), que contrariamente a lo descrito para otros anticuerpos, tienen la capacidad de inhibir la agregación celular o incluso de inducir la desagregación de células previamente agregadas por efecto del anticuerpo activador mAb452. Además, el mAbC y el mAbE presentan la capacidad de inhibir parcialmente la actividad enzimática de CD13. Por ensayos de competencia, se determinó que el mAbC y mAbE se unen a la molécula de CD13 en el mismo sitio o sitios muy cercanos, y que este sitio de unión es distinto del sitio de unión del mAb452. Las causas de las diferencias observadas en los efectos de estos distintos anticuerpos anti-CD13 aún no han sido determinadas. Teniendo presente que la adhesión celular y la fagocitosis son procesos activos que requieren de señalización intracelular y del rearrreglo del citoesqueleto de actina (por lo que es posible que compartan mecanismos moleculares en estos dos niveles[15, 34, 64]), hipotetizamos que el entrecruzamiento con estos anticuerpos, el mAbC y mAbE, no desencadenaría el proceso fagocítico como previamente fue descrito con el mAb452[63].

Contrario a lo esperado, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el entrecruzamiento de CD13 con los fragmentos FabC o FabE, similar a lo que ocurre con los fragmentos Fab452, presentan la capacidad de inducir la fagocitosis mediada por CD13. Para corroborar esto, determinamos que el entrecruzamiento de CD13 con los Fab452, FabC o FabE, con partículas fagocíticas, indujo la activación de señales tempranas de la fagocitosis como la activación de Syk. Asimismo, procesos posteriores conectados a la fagocitosis, como la producción de ROS, son también desencadenados durante la fagocitosis mediada por CD13 empleando cualquiera de los fragmentos Fabs anti-CD13. Aunado a esto, demostramos que el entrecruzamiento de CD13 con los Fab452, FabC o FabE estimula la activación de CR3, sugiriendo que el entrecruzamiento de CD13 también puede inducir la activación de otras señales intracelulares diferentes a las disparadas durante la fagocitosis.

Además de la fagocitosis, CD13 ha sido relacionado con otros procesos de internalización, como la endocitosis mediada por caveolina [54, 71] y endocitosis mediada por clatrina [55]. Debido a que CD13 es capaz de mediar distintos mecanismos de internalización, el empleo de partículas grandes en nuestros ensayos fagocíticos, cuya internalización forma fagosomas de 4 μ m [63], nos permite descartar otros procesos de

internalización que no sean fagocitosis por el empleo de los fragmentos Fab452, FabC y FabE. En los ensayos fagocíticos, tanto en células THP-1 como en hMDM, observamos que la fagocitosis a través de CD13 mediada por los FabC y FabE es de magnitud similar a la observada con los Fab452, ya que no encontramos diferencias significativas entre el porcentaje de fagocitosis e índice fagocítico obtenidos con los FabC y FabE respecto los del Fab452. Debido a que la agregación de CD13 puede ser conseguida con el empleo de los Fab452, FabC o FabE, estos datos sugieren que el factor clave para la activación de CD13 como receptor fagocítico es su agregación en la membrana celular, que permite aumentar su densidad local, como ha sido reportado para una gran cantidad de receptores fagocíticos, entre ellos los FcγRI y Dectina-1 [5, 18, 26, 72]. Al respecto, ha sido observado por ensayos de microscopia la relocalización de CD13 en las zonas de contacto célula-célula en la adhesión celular tras su entrecruzamiento con anticuerpo solubles [57, 66], o en las zonas de interacción de células fagocíticas y partículas fagocitables al entrecruzar a CD13 con estas partículas o anticuerpos solubles[61].

Durante los ensayos fagocíticos, con la finalidad de inducir diferentes niveles de agregación de CD13, empleamos diferentes concentraciones (2, 0.2 y 0.02 μg) de fragmentos Fab452, FabC o FabE para recubrir a las células fagocíticas, tanto en la línea celular monocítica THP-1, así como en los hMDM. Los resultados obtenidos muestran que existe un umbral de entrecruzamiento de CD13 diferente para inducir la fagocitosis entre las células THP-1 (que representan un estadio monocítico) y los hMDM (que representan un estadio de diferenciación a macrófago), siendo menor para los hMDM; pues con las células THP-1 sólo a las dos concentraciones mayores empleadas de los fragmentos Fab452, FabC o FabE (2 y 0.2 μg) se indujeron diferencias significativas en el porcentaje de fagocitosis e índice fagocítico respecto a la muestra control NoFab. En contraste, con los hMDM a cualquiera de las tres concentraciones de fragmentos Fab de anticuerpos anti-CD13, se obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de fagocitosis respecto a la muestra control NoFab. Esto último concuerda con los reportes que señalan a los macrófagos como células con una mayor capacidad fagocítica respecto a los monocitos [73, 74]. Esto sugiere

que la fagocitosis a través de CD13 está sujeta a los mecanismos que regulan la capacidad fagocítica de las células [10, 75].

El conjunto de datos obtenidos en este proyecto: fagocitosis de partículas, activación de Syk y producción de ROS durante la fagocitosis, muestran que el entrecruzamiento de CD13 con los FabC y FabE tiene un efecto distinto en la fagocitosis al observado en la adhesión celular. Mientras en la fagocitosis un efecto inductor, similar al inducido con los Fab452, en la adhesión celular tienen un efector inhibidor, y no inductor como los Fab452. La serie de datos que vinculan a CD13 con la transducción de señales en la agregación celular empleando los distintos anticuerpos anti-CD13, pueden ayudarnos a explicar las diferencias encontradas en los efectos del entrecruzamiento de CD13 con los distintos anticuerpos sobre la agregación celular (efecto inhibidor de los mAbC y mAbE; y activador del mAb452) y la fagocitosis (efecto activador de los Fab452, FabC y FabE). Por ensayos de competencia, sabemos que los mAbC y mAbE se unen a la molécula de CD13 a un sitio distinto al que se une el mAb452 (Claudia Garay y colaboradores, datos no publicados). Además, otros mAbs activadores de la agregación homotípica, WM15 y el MY7 se unen a lugares cercanos entre ellos y cercanos al sitio de unión del mAb 452 y del sitio catalítico, y el entrecruzamiento de CD13 con estos tres mAbs activa señales intracelulares que culminan en la agregación celular[57]. Dado que en la agregación celular, los mAbC y E poseen el mismo efecto inhibidor, pero diferente al inducido con el mAb452 (activador) (Claudia Garay y colaboradores, datos no publicados), entonces la diferencia observada en el efecto del mAbC y mAb E respecto al mAb452 en la agregación celular, podría deberse al sitio de unión de los anticuerpos. Con esto datos, podría proponerse que los efectos distintos observados pueden reflejar dos procesos diferentes. El primero, que posiblemente la unión de los anticuerpos activadores favorece la conformación cerrada del dímero de CD13, y con ello la activación de las vías de señalización relacionadas en este proceso, y los mAbC y E no lo hagan. Al respecto, en la determinación de la estructura cristalográfica de CD13, ha sido reportado que la unión de algunos sustratos o ligandos pueden estabilizar a CD13 en su conformación abierta o cerrada[53]. Esta arquitectura es de particular importancia, pues debido al arreglo tipo arco formado por el dímero de CD13 en la

membrana citoplasmática, la conversión de un dímero abierto-abierto a uno cerrado-cerrado, puede llevar a un cambio conformacional grande, que ocasione un cambio de 102 a 54Å en la distancia entre los extremos amino insertados a la membrana de cada monómero, y esto podría ser la base de los eventos de transducción de señal a los que CD13 ha sido asociado[53]. Este cambio conformacional podría ocasionar la activación de CD13 mediante la fosforilación de la Tyr6 en su extremo citoplasmático, como ha sido reportado que sucede en el entrecruzamiento de CD13 con el mAb452[59], y esta fosforilación, conlleva a la activación de señales corriente abajo como sucede en la adhesión celular. Debido a que la activación de la mayoría de los receptores fagocíticos está dada principalmente por su agrupamiento en la membrana y no necesariamente a un cambio conformacional[5, 12, 18], entonces suponiendo que los FabC y FabE no induzcan un cambio conformacional en CD13 que medie su activación como molécula de adhesión, esto no afecta su participación en la fagocitosis, ya que la agregación de CD13 con partícula fagocítica, puede ser lograda con cualquiera de los Fab anti-CD13 empleados, y desencadenar así el proceso fagocítico. Es importante señalar que con los Fab452 se observaron niveles ligeramente mayores en el porcentaje de fagocitosis respecto a los obtenidos con los FabC y FabE, aunque estas diferencias no fueron significativas. Este efecto podría deberse a que, aunque hipotéticamente los FabC y FabE favorezcan una estructura diferente a la del 452, ésta se vea “opacada” por el efecto de agregación de CD13 inducida por la unión de la partícula, permitiendo una aproximación de los extremos citosólicos de diferentes dímeros de CD13 durante el entrecruzamiento con la partícula fagocítica. De este modo, aunque con el entrecruzamiento de CD13 con los Fab452 el acercamiento de los extremos citoplasmáticos podría ser mayor que con los FabC y E, esto no es significativo. Sin embargo, en sistemas que son menos sensibles a la activación, este efecto podría ser más evidente, por ejemplo en los ensayos fagocíticos realizados con las células THP-1, en los que a pesar de encontrar valores similares en el porcentaje de fagocitosis, el índice fagocítico tuvo una diferencia significativa respecto al NoFab sólo en aquella muestra donde CD13 fue entrecruzado con el empleo de los Fab452, mientras que en el otro grupo de células, los hMDM, al poseer una mayor capacidad fagocítica y por ello mayor sensibilidad

a las señales que la desencadenan[10, 75], se pudieron observar valores significativos en el porcentaje de fagocitosis con los tres Fab452, C y E desde la concentración menor. En lo que refiere a índice fagocítico, aunque sólo se observó significancia a las dos concentraciones mayores de Fab, el efecto de los tres Fab452, C y E fue similar.

El segundo proceso posible que ocasione efectos diferentes tras la agregación de CD13 con los mAbC y mAbE respecto al mAb452, es que los mAbC y mAbE ocupen el sitio de interacción CD13-CD13 en la agregación celular, inhibiendo así este proceso, pues al respecto ha sido reportado que la agregación celular homotípica y heterotípica, inducida por el entrecruzamiento de CD13 con mAb452, es a través de una interacción homofílica, en donde el CD13 de un célula interactúa con otra molécula CD13 en la otra célula[58]. Así, aunque los mAbC y mAbE intervengan en la interacción CD13-CD13 durante la agregación celular, de nueva cuenta, esto no interfiere en la fagocitosis porque la agregación de CD13 puede ser inducida con cualquiera de los anticuerpos anti-CD13.

Debido a que la unión de los distintos Fab anti-CD13 induce la fagocitosis, se abre la posibilidad de que existan distintos ligandos que puedan unirse a CD13 en distintos sitios y también inducir la fagocitosis, como ha sido reportado para el CR3, el cual, en su función como receptor fagocítico, además de reconocer al fragmento iCb del complemento, también lo hace mediante el reconocimiento de distintas estructuras expresadas en distintos patógenos[76].

A pesar de compartir mecanismos moleculares similares en la transducción de señales entre la fagocitosis y la agregación celular, el mecanismo de activación del receptor para cada situación puede ser diferente. Ha sido reportado para algunos receptores, como el CR3, que su activación puede ocurrir por dos medios, uno por su agregación en la membrana celular para aumentar su avidéz por ligando [77] y la otra por señales de adentro hacia afuera, que inducen un cambio conformacional de CR3[78, 79]. La activación de CD13 como receptor fagocítico, parece ser que depende de su agregación dada por un partícula grande que presente ligando multivalente que induzcan la agregación del receptor, como ha sido descrito para un gran cantidad de receptores fagocíticos[80].

El o los ligandos naturales de CD13 capaces de inducir la fagocitosis de partículas grandes aún no han sido determinados. Sin embargo, han sido identificados ligandos naturales de CD13 mono- y polivalentes, así como endógenos y exógenos. Dentro de los ligandos endógenos, existe evidencia que péptidos con el motivo Asn-Gly-Arg (NGR) se unen a CD13, e incluso han sido empleados en tratamientos de inmuno- y quimioterapias en diversos tipos de tumores [45]; y de particular importancia a este proyecto, ha sido propuesto que galectina-3 podría constituir un ligando natural de CD13 que induzca fagocitosis[63]. Esta propuesta se basa en fuertes evidencias que lo sugieren: ha sido reportado la interacción natural de CD13 con galectina-3, en ensayos de cromatografía de afinidad [81], y en ensayos de “biopanning” de fagos filamentosos expresando secuencias peptídicas. Además, se ha reportado la colocalización de CD13 y galectina-3 en la membrana de células HUVEC tras la adición de galectina-3 a esas células [82], así como la coinmunoprecipitación de galectina-3 y CD13 en células U-937[65]. Galectina-3 es capaz de unirse a beta-galactósidos expresados en la superficie de bacterias[83, 84] , organismos fúngicos [85, 86] y parásitos[87]. Importantemente, galectina-3 es capaz de formar complejos multivalentes al polimerizarse, los cuales tienen la capacidad de interactuar con varios ligandos al mismo tiempo y de entrecruzar glicoproteínas de la superficie celular[88]. Asimismo, ha sido reportado que galectina-3 puede mediar interacciones célula-célula[89] y célula-matriz extracelular[90], migración celular (monocitos y macrófagos)[91], así como su participación en procesos celulares como el estallido respiratorio [92]y la fagocitosis[93]. Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar si galectina-3 puede fungir como una opsonina que induzca la fagocitosis *in vivo* mediada por CD13.

En otro orden de ideas, durante la caracterización de CD13, se observó que el entrecruzamiento de CD13 con Fab452 y un anticuerpo secundario soluble induce la fosforilación de Syk[63]. En un mayor acercamiento a lo que podría ocurrir naturalmente durante el proceso fagocítico, indujimos el entrecruzamiento de CD13 mediado por los fragmentos Fab452, FabC y FabE con partículas fagocitables, de la misma forma a la utilizada para los ensayos de fagocitosis. Determinamos que el entrecruzamiento de CD13 utilizando esta técnica indujo también la fosforilación de Syk empleando los Fab452, FabC y FabE.

Encontramos para la fosforilación de Syk, tanto en las células THP-1 como hMDM, que el pico de fosforilación ocurre antes del minuto de estimulación, y que en los hMDM la fosforilación de Syk es sostenida por más tiempo, lo que podría ser una causa de la fagocitosis mayor observada en los hMDM respecto a las células THP-1. Como se mencionó anteriormente, las células THP-1 se encuentran en un estado monocítico, a diferencia de los hMDM que son macrófagos con un fenotipo M0. Un estudio demostró que la fosforilación de Syk durante la fagocitosis mediada por el FcγRI varía de acuerdo al estado de diferenciación celular [75], por lo que es posible que las diferencias observadas en la fosforilación de Syk inducida por fagocitosis en células THP-1 vs hMDM estén dadas por el estado de diferenciación.

Debido a que el entrecruzamiento de CD13 induce la fosforilación de Syk, es probable que Syk interactúe directamente con CD13 para ser activada. Syk interactúa a través de su dominio SH2, con sitios que cuentan con motivos de tirosinas fosforiladas, como las que se encuentran en los motivos ITAM de los FcγRI; pero también ha sido reportado que puede interactuar con Tyr fosforiladas de monómeros distintos, como sucede con Dectina-1[25]. Recientemente, ha sido reportado que CD13 es fosforilada en la Tyr6 (que se encuentra en su extremo citoplasmático)[59], y debido a que CD13 es expresada como dímero, durante su entrecruzamiento, es posible que estas tirosinas fosforiladas puedan funcionar como sitios de reconocimiento por el dominio SH2 de Syk para inducir su activación. Sin embargo, es necesario indagar si este es el mecanismo de activación de Syk durante el entrecruzamiento de CD13, o si existen otras moléculas accesorias que estén mediando dicha activación.

En el mismo estudio de nuestro laboratorio que describe a CD13 como un receptor fagocítico primario, se encontró que existe un componente de la fagocitosis mediada por CD13 que no es dependiente de la activación de Syk[63], esto también ha sido descrito para otros receptores fagocíticos[94]. Esto indica que, aunque la activación de Syk interviene en la fagocitosis mediada por CD13, no es primordial para este proceso, por lo que su activación podría “servir” para otros propósitos. En relación a esto, ha sido demostrado que la activación de Syk, además de participar en el rearrreglo del citoesqueleto de actina, está

involucrada en otras respuestas celulares, como la producción de ROS en la fagocitosis mediada por Dectina-1 [95], la movilización de Ca^{2+} , degranulación, producción de citocinas y el metabolismo de ácido araquidónico durante la señalización mediada por los $Fc\gamma RI$ u otros receptores que posean el dominio de reconocimiento del motivo SH-2 de Syk [96-98]. Este trabajo abre la puerta a otras investigaciones que vinculen a la activación de Syk durante la fagocitosis mediada por CD13 con algunas de estas funciones. En principio, podría verificarse si existe una relación entre la activación de CD13 y la producción de ROS, pues en el presente proyecto, determinamos que ambos procesos ocurren durante la fagocitosis mediada por CD13.

Existe una amplia relación entre la producción de ROS y la fagocitosis, con la finalidad de degradar patógenos que hayan sido internalizados por este medio (actividad microbicida). Durante la maduración del fagosoma, componentes de la NADPH oxidasa se ensamblan en la membrana del fagosoma, lo que lleva a la producción de ROS. El ensamblaje y activación de NOX2 es altamente regulado y es disparado por la unión de partículas, bacterias, hongos o mediadores inflamatorios solubles a receptores específicos en la superficie de células fagocíticas[99, 100]. Como ha sido mencionado, también determinamos que la fagocitosis a través de CD13 mediada por los Fab452, Fab y FabE, es capaz de inducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Este hecho evidencia que los fagosomas formados por la fagocitosis mediada por CD13 son capaces de madurar adecuadamente y que la fagocitosis mediada por CD13, al estar asociada con la producción de ROS, esté posiblemente vinculada con la internalización de agentes microbianos. Importantly, la inducción de la producción de ROS por fagocitosis a través de CD13 únicamente fue detectada en la población de macrófagos M1, es decir, aquellos macrófagos con un fenotipo inflamatorio, lo que sugiere que la fagocitosis a través de CD13, nuevamente se encuentra regulada también por el fenotipo celular en cual se está llevando a cabo. Estos datos concuerdan con la evidencia de que los macrófagos M1 son aquellos capaces de producir ROS dentro de todas las poblaciones de macrófagos[39, 40].

Finalmente, demostramos que el entrecruzamiento de CD13 con los Fab452, FabC o FabE induce la activación de CR3. La activación de CR3 puede ocurrir por dos medios, por

su agregación en la membrana, que puede ser dada por un ligando multivalente, o por la activación “inside-out” de CR3 derivada de la señalización de otros receptores. Por lo tanto, queda por determinar la vía de activación de CR3 por el entrecruzamiento de CD13. Es posible que durante la agregación de CD13 se coagregue a CR3, como cuando CD13 es coagregada con los Fc γ RI, y como consecuencia se lleve a cabo su activación[61], o bien que las vías de señalización encendidas durante el entrecruzamiento de CD13 lleven a la activación inside-out de CR3. Al respecto, por ensayos de microscopia, ha sido observado la relocalización de CR3 a la copa fagocítica tras el entrecruzamiento de los Fc γ Rs[77], sin embargo no ha sido reportado la colocación de CR3 durante el entrecruzamiento de CD13. La activación de CR3 tras el entrecruzamiento de CD13 con los FabC y FabE, descarta que la agregación observada entre las células U937 tras el entrecruzamiento de CD13 con el mAb452 [57] dependa de la activación de CR3, dado que el entrecruzamiento con los FabC y FabE también fue capaz de inducir su activación. El hecho de que la activación de CR3 se induzca tras la agregación de CD13 con cualquiera de los fragmentos anti-CD13 empleados en este proyecto, sugiere que el entrecruzamiento de CD13 basta para activar otras vías de señalización diferentes a la fagocitosis.

El hallazgo de que varios anticuerpos induzcan la fagocitosis mediada por CD13 y el tener presente que estos se unan a distintos sitios de CD13, sugiere algunas de las características de los ligandos de CD13 in vivo, por ejemplo que pueda unirse a distintos sitios de CD13 para inducir la fagocitosis, o que CD13 pueda poseer distintos ligandos que se unan a distintos sitios para inducir su agregación y con ellos la fagocitosis. En la identificación de los ligandos naturales de CD13, es importante tener presente que la interacción de CD13 con la partícula, puede ser directa por que CD13 reconozca estructuras de patógenos, o bien que CD13 funja como un receptor opsónico mediante su interacción con Galectina-3, o ambos casos. Aún queda pendiente estudiar con más detalle las vías de señalización desencadenadas en la fagocitosis mediada por CD13, y su posible nexa con procesos relativos a la fagocitosis, como la generación de óxido nítrico, producción y secreción de citocinas, o la presentación de antígenos provenientes de la degradación de patógenos.

8. CONCLUSIONES

El entrecruzamiento de CD13 con los fragmentos FabC y FabE, induce la fagocitosis de partículas grandes al igual que con los fragmentos Fab452.

El conjunto de datos obtenidos en el presente trabajo, sugiere que el principal factor para inducir la fagocitosis de CD13, es su agregación dada por una partícula grande.

El curso de la fagocitosis mediada por CD13, empleando los Fab452, FabC y FabE, sigue una misma ruta bioquímica, ya que el empleo de cualquiera de estos fragmentos permitió la activación de Syk y la producción de especies reactivas de oxígeno, ambos procesos relacionados con la fagocitosis.

El entrecruzamiento de CD13 con los fragmentos Fab452, FabC o FabE induce la activación de CR3; sugiriendo que la agregación de CD13 con cualquiera de estos fragmentos induce la activación de señalización además de la que media la fagocitosis.

9. PERSPECTIVAS

- Investigar el mecanismo que subyace la diferencia del efecto inhibitor en la adhesión celular y activador en la fagocitosis mediada por CD13 de los mAbC y mAbE. Queda por determinar si esta diferencia se debe a que por el sitio de unión a CD13, los mAbC y mAbE interfieran en la interacción de CD13 de una célula con otra molécula homóloga en la otra célula en la adhesión celular, o porque estos mAbs no inducen la vía de señalización en la adhesión celular.
- Determinar el ligando natural de CD13 que media su activación como receptor fagocítico; y verificar su efecto en la agregación celular mediada por CD13.
- Determinar el papel de Syk en la fagocitosis mediada por CD13. En el presente trabajo se demostró que la fagocitosis mediada por CD13 induce la activación de Syk, pero también ha sido demostrado que no es esencial en este proceso. Queda entonces determinar la finalidad de la activación de Syk en la fagocitosis por CD13. Una propuesta es evaluar su participación en la producción de ROS.
- Determinar la activación de otras moléculas en la vía de señalización fagocítica de CD13. Incluyendo el estudio del papel de la Tyr6 de CD13 en la activación de esta vía de señalización.

10. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

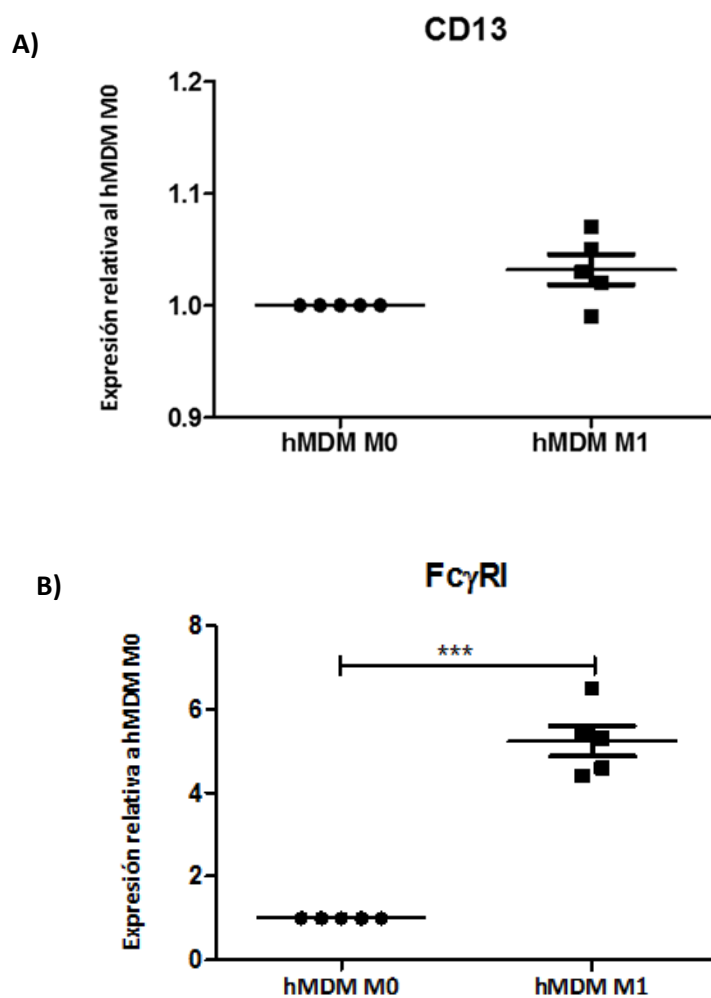


Figura Suplementaria 1. Expresión de CD13 y FcγRI en hMDM en estadio M0 y M1. hMDM M0 y M1 se incubaron con 2µg de fragmentos Fab452 o 4µg Fab32.2 en 250µL de medio completo por cada millón de células, por 30min a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron e incubaron con anticuerpo secundario conjugado a FITC y fueron analizadas por citometría de flujo. Se muestra el promedio de la intensidad media de fluorescencia de 5 experimentos de hMDM M1 normalizados respecto a la expresión en hMDM M0. Prueba t, ***p≤0.0005 A) Expresión de CD13. La polarización del estadio M0 al M1 de los hMDM no modificó la expresión de CD13. B) Expresión del FcγRI. La polarización del estadio M0 al M1 incrementó significativamente la expresión del FcγRI.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Underhill, D.M. and H.S. Goodridge, *Information processing during phagocytosis*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(7): p. 492-502.
2. Underhill, D.M. and A. Ozinsky, *Phagocytosis of microbes: complexity in action*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 825-52.
3. Aderem, A. and D.M. Underhill, *MECHANISMS OF PHAGOCYTOSIS IN MACROPHAGES*. Annual Review of Immunology, 1999. **17**(1): p. 593-623.
4. Blander, J.M. and R. Medzhitov, *On regulation of phagosome maturation and antigen presentation*. Nat Immunol, 2006. **7**(10): p. 1029-1035.
5. Freeman, S.A. and S. Grinstein, *Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton*. Immunol Rev, 2014. **262**(1): p. 193-215.
6. Jutras, I. and M. Desjardins, *Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 511-27.
7. Rabinovitch, M., *Professional and non-professional phagocytes: an introduction*. Trends Cell Biol, 1995. **5**(3): p. 85-7.
8. Moretti, J. and J.M. Blander, *Insights into phagocytosis-coupled activation of pattern recognition receptors and inflammasomes*. Curr Opin Immunol, 2014. **26**: p. 100-10.
9. Loffler, B., et al., *Staphylococcus aureus persistence in non-professional phagocytes*. Int J Med Microbiol, 2014. **304**(2): p. 170-6.
10. Taylor, P.R., et al., *Macrophage receptors and immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 901-44.
11. Charles A. Janeway, J.a. and R. Medzhitov, *INNATE IMMUNE RECOGNITION*. Annual Review of Immunology, 2002. **20**(1): p. 197-216.
12. Flannagan, R.S., V. Jaumouille, and S. Grinstein, *The cell biology of phagocytosis*. Annu Rev Pathol, 2012. **7**: p. 61-98.
13. Levin, R., S. Grinstein, and D. Schlam, *Phosphoinositides in phagocytosis and macropinocytosis*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1851**(6): p. 805-823.
14. Janeway, C.A. and R. Medzhitov, *INNATE IMMUNE RECOGNITION*. Annual Review of Immunology, 2002. **20**(1): p. 197-216.
15. Niedergang, F. and P. Chavrier, *Regulation of Phagocytosis by Rho GTPases*, in *Bacterial Virulence Factors and Rho GTPases*, P. Boquet and E. Lemichez, Editors. 2005, Springer Berlin Heidelberg. p. 43-60.
16. Griffiths, G., *On phagosome individuality and membrane signalling networks*. Trends in Cell Biology, 2004. **14**(7): p. 343-351.
17. Bohlson, S., *Phagocytosis*, in *Molecular Life Sciences*, R.D. Wells, et al., Editors. 2015, Springer New York. p. 1-4.
18. Goodridge, H.S., D.M. Underhill, and N. Touret, *Mechanisms of Fc Receptor and Dectin-1 Activation for Phagocytosis*. Traffic, 2012. **13**(8): p. 1062-1071.
19. Beningo, K.A. and Y.-I. Wang, *Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target*. Journal of Cell Science, 2002. **115**(4): p. 849-856.
20. Flannagan, R.S., et al., *Dynamic macrophage "probing" is required for the efficient capture of phagocytic targets*. The Journal of Cell Biology, 2010. **191**(6): p. 1205-1218.
21. Greenberg, S. and S. Grinstein, *Phagocytosis and innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(1): p. 136-45.

22. Love, P.E. and E.W. Shores, *ITAM Multiplicity and Thymocyte Selection*. *Immunity*. **12**(6): p. 591-597.
23. Kiefer, F., et al., *The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fcγ receptor signaling in macrophages and neutrophils*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(7): p. 4209-20.
24. Herre, J., et al., *Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages*. *Blood*, 2004. **104**(13): p. 4038-4045.
25. Rogers, N.C., et al., *Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins*. *Immunity*, 2005. **22**(4): p. 507-17.
26. Goodridge, H.S., et al., *Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a phagocytic synapse*. *Nature*, 2011. **472**(7344): p. 471-475.
27. Vachon, E., et al., *CD44 is a phagocytic receptor*. *Blood*, 2006. **107**(10): p. 4149-4158.
28. Huynh, K.K., et al., *Fusion, fission, and secretion during phagocytosis*. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 2007. **22**: p. 366-372.
29. Botelho, R.J. and S. Grinstein, *Phagocytosis*. *Curr Biol*, 2011. **21**(14): p. R533-8.
30. Joshi, T., J. Butchar, and S. Tridandapani, *Fcγ Receptor Signaling in Phagocytes*. *International Journal of Hematology*, 2006. **84**(3): p. 210-216.
31. Swanson, J.A. and A.D. Hoppe, *The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2004. **76**(6): p. 1093-1103.
32. Okkenhaug, K., *Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells*. *Annu Rev Immunol*, 2013. **31**: p. 675-704.
33. Caron, E. and A. Hall, *Identification of Two Distinct Mechanisms of Phagocytosis Controlled by Different Rho GTPases*. *Science*, 1998. **282**(5394): p. 1717-1721.
34. May, R.C. and L.M. Machesky, *Phagocytosis and the actin cytoskeleton*. *Journal of Cell Science*, 2001. **114**(6): p. 1061-1077.
35. Tollis, S., et al., *The zipper mechanism in phagocytosis: energetic requirements and variability in phagocytic cup shape*. *BMC Systems Biology*, 2010. **4**: p. 149-149.
36. Mao, Y. and S.C. Finnemann, *Regulation of phagocytosis by Rho GTPases*. *Small GTPases*, 2015. **6**(2): p. 89-99.
37. Nunes, P., N. Demarex, and M.C. Dinauer, *Regulation of the NADPH Oxidase and Associated Ion Fluxes During Phagocytosis*. *Traffic*, 2013. **14**(11): p. 1118-1131.
38. Matute, J.D., et al., *A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity*. *Blood*, 2009. **114**(15): p. 3309-3315.
39. Martinez, F.O. and S. Gordon, *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment*. *F1000Prime Reports*, 2014. **6**: p. 13.
40. Canton, J., *Phagosome maturation in polarized macrophages*. *J Leukoc Biol*, 2014. **96**(5): p. 729-38.
41. Hooper, N.M., *Families of zinc metalloproteases*. *FEBS Lett*, 1994. **354**(1): p. 1-6.
42. Mina-Osorio, P., *The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target*. *Trends in Molecular Medicine*. **14**(8): p. 361-371.
43. Ashmun, R. and A. Look, *Metalloprotease activity of CD13/aminopeptidase N on the surface of human myeloid cells*. *Blood*, 1990. **75**(2): p. 462-469.
44. Bordessoule, D., et al., *Immunohistological patterns of myeloid antigens: tissue distribution of CD13, CD14, CD16, CD31, CD36, CD65, CD66 and CD67*. *British Journal of Haematology*, 1993. **83**(3): p. 370-383.
45. Pasqualini, R., et al., *Aminopeptidase N Is a Receptor for Tumor-homing Peptides and a Target for Inhibiting Angiogenesis*. *Cancer Research*, 2000. **60**(3): p. 722-727.

46. Riemann, D., A. Kehlen, and J. Langner, *CD13—not just a marker in leukemia typing*. Immunology Today. **20**(2): p. 83-88.
47. Fernández, D., et al., *Peptidase activities in human semen*. Peptides, 2002. **23**(3): p. 461-468.
48. Danielsen, E.M., *Dimeric Assembly of Enterocyte Brush Border Enzymes*. Biochemistry, 1994. **33**(6): p. 1599-1605.
49. Santos, A.N., et al., *Aminopeptidase N/CD13 Is Associated with Raft Membrane Microdomains in Monocytes*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **269**(1): p. 143-148.
50. Watt, V. and H. Willard, *The human aminopeptidase N gene: isolation, chromosome localization, and DNA polymorphism analysis*. Human Genetics, 1990. **85**(6): p. 651-654.
51. Shapiro, L.H., et al., *Separate promoters control transcription of the human aminopeptidase N gene in myeloid and intestinal epithelial cells*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(18): p. 11999-12007.
52. Sjöström, H., O. Norén, and J. Olsen, *Structure and Function of Aminopeptidase N*, in *Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases 2*, J. Langner and S. Ansoerge, Editors. 2002, Springer US. p. 25-34.
53. Wong, A.H., D. Zhou, and J.M. Rini, *The X-ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing*. J Biol Chem, 2012. **287**(44): p. 36804-13.
54. Nomura, R., et al., *Human Coronavirus 229E Binds to CD13 in Rafts and Enters the Cell through Caveolae*. Journal of Virology, 2004. **78**(16): p. 8701-8708.
55. Hansen, G.H., et al., *The Coronavirus Transmissible Gastroenteritis Virus Causes Infection after Receptor-Mediated Endocytosis and Acid-Dependent Fusion with an Intracellular Compartment*. Journal of Virology, 1998. **72**(1): p. 527-534.
56. Söderberg, C., et al., *CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection*. Journal of Virology, 1993. **67**(11): p. 6576-6585.
57. Mina-Osorio, P., L.H. Shapiro, and E. Ortega, *CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells*. Journal of Leukocyte Biology, 2006. **79**(4): p. 719-730.
58. Ghosh, M., et al., *Molecular mechanisms regulating CD13-mediated adhesion*. Immunology, 2014. **142**(4): p. 636-647.
59. Subramani, J., et al., *Tyrosine Phosphorylation of CD13 Regulates Inflammatory Cell–Cell Adhesion and Monocyte Trafficking*. The Journal of Immunology, 2013. **191**(7): p. 3905-3912.
60. Riemann, D., et al., *Functional co-localization of monocytic aminopeptidase N/CD13 with the Fcγ receptors CD32 and CD64*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. **331**(4): p. 1408-1412.
61. Mina-Osorio, P. and E. Ortega, *Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγRs in human monocytes*. Journal of Leukocyte Biology, 2005. **77**(6): p. 1008-1017.
62. Villase, et al., *Aminopeptidase N (CD13) Is Involved in Phagocytic Processes in Human Dendritic Cells and Macrophages*. BioMed Research International, 2013. **2013**: p. 12.
63. Licon-Limón, I., et al., *CD13 mediates phagocytosis in human monocytic cells*. Journal of Leukocyte Biology, 2015. **98**(1): p. 85-98.
64. Cougoule, C., et al., *Phagocytosis, an alternative model system for the study of cell adhesion*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2004. **15**(6): p. 679-689.

65. Mina-Osorio, P., I. Soto-Cruz, and E. Ortega, *A role for galectin-3 in CD13-mediated homotypic aggregation of monocytes*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **353**(3): p. 605-610.
66. Mina-Osorio, P., et al., *CD13 is a novel mediator of monocytic/endothelial cell adhesion*. Journal of Leukocyte Biology, 2008. **84**(2): p. 448-459.
67. Kaplan, D., et al., *Correlation between ZAP-70, phospho-ZAP-70, and phospho-Syk expression in leukemic cells from patients with CLL*. Cytometry Part B: Clinical Cytometry, 2010. **78B**(2): p. 115-122.
68. Chen, L., et al., *SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma*. Blood, 2008. **111**(4): p. 2230-2237.
69. Petrovic, N., et al., *CD13/APN regulates endothelial invasion and filopodia formation*. Blood, 2007. **110**(1): p. 142-150.
70. Santos, A.N., et al., *Aminopeptidase N/CD13 Is Directly Linked to Signal Transduction Pathways in Monocytes*. Cellular Immunology, 2000. **201**(1): p. 22-32.
71. Miki, T., et al., *The Reversion-inducing Cysteine-rich Protein with Kazal Motifs (RECK) Interacts with Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase and CD13/Aminopeptidase N and Modulates Their Endocytic Pathways*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(16): p. 12341-12352.
72. Ezekowitz, R.A., et al., *Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells*. The Journal of Experimental Medicine, 1990. **172**(6): p. 1785-1794.
73. Robbins, C. and F. Swirski, *The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010. **67**(16): p. 2685-2693.
74. Verschoor, C., A. Puchta, and D.E. Bowdish, *The Macrophage*, in *Leucocytes*, R.B. Ashman, Editor. 2012, Humana Press. p. 139-156.
75. Hallal-Calleros, C., et al., *Syk and Lyn phosphorylation induced by FcγRI and FcγRII crosslinking is determined by the differentiation state of U-937 monocytic cells*. Immunology Letters, 2005. **99**(2): p. 169-179.
76. Le Cabec, V., et al., *Complement Receptor 3 (CD11b/CD18) Mediates Type I and Type II Phagocytosis During Nonopsonic and Opsonic Phagocytosis, Respectively*. The Journal of Immunology, 2002. **169**(4): p. 2003-2009.
77. Jongstra-Bilen, J., R. Harrison, and S. Grinstein, *Fcγ-receptors Induce Mac-1 (CD11b/CD18) Mobilization and Accumulation in the Phagocytic Cup for Optimal Phagocytosis*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(46): p. 45720-45729.
78. Sendide, K., et al., *Cross-Talk between CD14 and Complement Receptor 3 Promotes Phagocytosis of Mycobacteria: Regulation by Phosphatidylinositol 3-Kinase and Cytohesin-1*. The Journal of Immunology, 2005. **174**(7): p. 4210-4219.
79. Harokopakis, E. and G. Hajishengallis, *Integrin activation by bacterial fimbriae through a pathway involving CD14, Toll-like receptor 2, and phosphatidylinositol-3-kinase*. European Journal of Immunology, 2005. **35**(4): p. 1201-1210.
80. Bruhns, P., et al., *Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses*. Blood, 2009. **113**(16): p. 3716-3725.
81. Kovak, M.R., et al., *Investigation of Galectin-3 Function in the Reproductive Tract by Identification of Binding Ligands in Human Seminal Plasma*. American Journal of Reproductive Immunology, 2014. **72**(4): p. 403-412.

82. Yang, E., et al., *Aminopeptidase N/CD13 induces angiogenesis through interaction with a pro-angiogenic protein, galectin-3*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **363**(2): p. 336-341.
83. Mey, A., et al., *The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaccharides via two independent sites*. The Journal of Immunology, 1996. **156**(4): p. 1572-7.
84. Barboni, E., S. Coade, and A. Fiori, *The binding of mycolic acids to galectin-3: A novel interaction between a host soluble lectin and trafficking mycobacterial lipids?* FEBS Letters, 2005. **579**(30): p. 6749-6755.
85. Fradin, C., D. Poulain, and T. Jouault, *β -1,2-Linked Oligomannosides from *Candida albicans* Bind to a 32-Kilodalton Macrophage Membrane Protein Homologous to the Mammalian Lectin Galectin-3*. Infection and Immunity, 2000. **68**(8): p. 4391-4398.
86. Kohatsu, L., et al., *Galectin-3 Induces Death of *Candida* Species Expressing Specific β -1,2-Linked Mannans*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(7): p. 4718-4726.
87. van den Berg, T.K., et al., *LacdiNAc-Glycans Constitute a Parasite Pattern for Galectin-3-Mediated Immune Recognition*. The Journal of Immunology, 2004. **173**(3): p. 1902-1907.
88. Sato, S. and J. Nieminen, *Seeing strangers or announcing "danger": Galectin-3 in two models of innate immunity*. Glycoconjugate Journal, 2002. **19**(7-9): p. 583-591.
89. Inohara, H., et al., *Interactions between Galectin-3 and Mac-2-Binding Protein Mediate Cell-Cell Adhesion*. Cancer Research, 1996. **56**(19): p. 4530-4534.
90. Kuwabara, I. and F.T. Liu, *Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin*. The Journal of Immunology, 1996. **156**(10): p. 3939-44.
91. Sano, H., et al., *Human Galectin-3 Is a Novel Chemoattractant for Monocytes and Macrophages*. The Journal of Immunology, 2000. **165**(4): p. 2156-2164.
92. Karlsson, A., et al., *Galectin-3 Activates the NADPH-Oxidase in Exudated but not Peripheral Blood Neutrophils*. Blood, 1998. **91**(9): p. 3430-3438.
93. Karlsson, A., et al., *Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils*. Glycobiology, 2009. **19**(1): p. 16-20.
94. Shi, Y., et al., *Protein-tyrosine kinase Syk is required for pathogen engulfment in complement-mediated phagocytosis*. Blood, 2006. **107**(11): p. 4554-4562.
95. Underhill, D.M., et al., *Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production*. Vol. 106. 2005. 2543-2550.
96. Kiefer, F., et al., *The Syk Protein Tyrosine Kinase Is Essential for Fc γ Receptor Signaling in Macrophages and Neutrophils*. Molecular and Cellular Biology, 1998. **18**(7): p. 4209-4220.
97. Mócsai, A., J. Ruland, and V.L.J. Tybulewicz, *The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(6): p. 387-402.
98. Bradshaw, J.M., *The Src, Syk, and Tec family kinases: Distinct types of molecular switches*. Cellular Signalling, 2010. **22**(8): p. 1175-1184.
99. Segal, A., et al., *Components and Organisation of the NADPH Oxidase of Phagocytic Cells, the Paradigm for an Electron Transport Chain across the Plasma Membrane*, in *Plasma Membrane Redox Systems and their Role in Biological Stress and Disease*, H. Asard, A. Bérczi, and R. Caubergs, Editors. 1998, Springer Netherlands. p. 69-101.
100. Yates, R.M., *Redox Considerations in the Phagosome: Current Concepts, Controversies, and Future Challenges*. Antioxidants & Redox Signaling, 2012. **18**(6): p. 628-629.