



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ESTUDIO DEL ROL DE IgG SOLUBLE EN LA PRODUCCIÓN DE TNF- α
INDUCIDA POR LIPOPOLISACÁRIDO EN CÉLULAS MONOCÍTICAS
HUMANAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

OMAR VARGAS HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. JORGE MANUEL VÁZQUEZ RAMOS
FACULTAD DE QUÍMICA
DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Marzo, 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A Dios,

por el Universo, la Tierra, la Vida y la Existencia.

A Jesucristo,

por ser el camino a Dios y el perdón de los pecados.

A mi increíble madre Fadia,

por darme la vida, sacrificarse por mí, salvarme, defenderme, apoyarme en todo momento, desde pequeño hasta adulto, sus consejos, corajes y lágrimas, por todo lo que sé de los valores morales, el bien y el mal, por acercarme a Dios y a mi hija, por mostrarme lo que vale la pena y lo que no, por apoyar este proyecto y mi formación profesional y siempre insistir en terminar, y claro, por ser mi primer amor.

A mi padre Marcos Gerardo,

por estar ahí, cerca de mí, apoyándome, dándome consejos y regaños, impulsándome y siempre estar a lado de mi madre, amándonos a ella y a mí.

A mi pequeña y hermosa hija Fadia,

mi gran amor, que me ha inspirado desde que nació con su pequeña sonrisa y su caluroso abrazo, el brillo de sus ojos es una fuente inagotable de inspiración y poder, la responsabilidad de verla crecer y demostrarle que, aunque las cosas tardan en pasar, no debemos rendirnos, me impulsó siempre para terminar estos estudios de doctorado, además de la gran alegría continua que tengo por su encantadora presencia.

A mi gran amigo Carlos Arturo Barba,

por los años de amistad, discusiones, diseños experimentales, baile, política e innumerables temas que siempre platicábamos, en persona, en su casa, en la calle, en el laboratorio o por internet, siempre siendo un excelente ser humano y un apoyo académico invaluable.

A Elvira Ostría y Arturo Barba,

los padres de Carlos, que me trataron como a un hijo y me recibieron en su casa durante varios años, siempre me apoyaron.

A mi amigo Erick Mondragón,

muy buen amigo desde la preparatoria, en las buenas y en las malas, siempre dispuesto a apoyar, siempre motivando y dando razones para seguir y mi compadre.

A mi amigo Francisco Leyva,

por apoyarme para vivir en su casa, cuando no tenía donde vivir.

A mi amigo Omar Durán,

por las platicas interminables del propósito de la vida, su amistad y consejo honesto.

A Irma Mitre,

por su amistad y estima, apoyo y platicas en el laboratorio.

A Gloria Vizcaíno,

por su amistad, apoyo emocional, confianza y honestidad.

A José Luis Ventura y a Laura Ventura,

por enseñarme la gran mayoría de las técnicas experimentales que usé en este trabajo, darme consejos para mejorar mis resultados.

A mi tutor Sigifredo Pedraza,

por encargarse de este proyecto, académica y económicamente, por ser el primer responsable, por diseñar experimentos y por hacerlos conmigo, editar el manuscrito en inglés y no menos importante, por darme su apoyo personal más allá de sus obligaciones como tutor, siempre atento y dispuesto a ayudar dando consejos y ejemplos de superación y disciplina.

A mi tutor Alejandro Zentella,

por confiar en mí, desde el principio, su voto de confianza siempre fue un pilar para continuar con el proyecto a pesar de las equivocaciones y malos momentos; siempre me apoyó y defendió en los exámenes en los que estuvo presente y patrocinó con recursos materiales, humanos y académicos todos los proyectos en los que participé.

A mi Comité Tutorial, Jorge Manuel Vázquez, Carlos Rosales y Armando Gómez,

por sus múltiples observaciones y seguimiento puntual a mis progresos, largas discusiones y enfrentamientos académicos, siempre mostrándome la forma de probar y argumentar mis ideas. QEPD Armando.

A mi jurado de grado, Arturo Edgar Zenteno, Enrique Ortega, María Antonieta Chávez, Claudia González y Paula Licona,

por aceptar revisar esta tesis y darme sus observaciones puntuales y muy acertadas acerca de los errores de redacción e interpretación de resultados.

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas,

por darme la oportunidad de terminar el doctorado, con prórrogas y acompañamiento a lo largo de toda mi estancia en el posgrado, particularmente a Leticia García, Norma Trejo, y Julio Palacios.

Al CONACYT,

por los apoyos académicos y becas.

Al INCMNSZ,

por las prestaciones y apoyos académicos ya que es donde se realizó el proyecto.

A la UNAM,

por ser el alma máter.

**Estudio del rol de IgG
soluble en la producción
de TNF- α inducida por
lipopolisacárido en
células monocíticas
humanas**

Índice

Resumen	10
1. Introducción	11
1.1. De la inmunidad innata y los receptores TLRs.....	11
1.2. Del receptor TLR4 y el reconocimiento de LPS.....	12
1.3. De las funciones de TNF- α	13
1.4. De la producción de TNF- α inducida por LPS.....	14
1.5. De la inmunidad adaptativa y los anticuerpos	17
1.6. De la diversidad y estructura de los anticuerpos	18
1.7. Del estado conformacional de IgG	21
1.8. De los receptores de Fc de IgG (Fc γ Rs).....	22
1.9. De las vías de señalización de los receptores Fc γ Rs.....	23
1.10. De la relación entre TLR4 y Fc γ Rs	25
2. Planteamiento del problema	28
3. Hipótesis	29
4. Objetivo general	29
4.1. Objetivos particulares.....	29
5. Materiales y métodos	31
5.1. Condiciones generales.....	31
5.2. Determinación del estado conformacional de sIgG	32
5.3. Cultivo celular.....	32
5.4. Obtención de CMN de sangre periférica	33
5.5. Estimulación celular	34
5.6. Marcaje de receptores de la superficie membranal y detección intracelular de TNF- α para citometría de flujo.....	35
5.7. ELISA para TNF- α	36
5.8. Transcripción reversa y PCR en tiempo real para la valoración de la expresión genética de TNF- α	37
5.9. Detección intranuclear de NF- κ B p65 por citometría de flujo.....	37
5.10. Western Blot	39
5.11. Transfección de siRNAs de receptores Fc γ Rs.....	40
5.12. Análisis estadístico	41

6. Resultados	42
6.1. Determinación del estado conformacional de la IgG que se usó para los estímulos	42
6.2. Caracterización de receptores TLRs y FcγRs en los monocitos de CMN de sangre periférica	44
6.3. Solo los monocitos de CMN de sangre periférica respondieron a los estímulos y no los linfocitos	47
6.4. Curva dosis-respuesta de monocitos de CMN de sangre periférica que fueron co-estimulados con LPS + sIgG.....	49
6.5. Monocitos de CMN de sangre periférica no aumentaron la producción de TNF-α cuando se co-estimularon con el ligando P3C de TLR2 + sIgG.....	50
6.6. Cambio de modelo de estudio: de monocitos de CMN de sangre periférica a la línea celular monocítica THP-1	53
6.7. Caracterización de los receptores TLRs y FcγRs en la línea celular THP-1.....	53
6.8. Curva dosis-respuesta de TNF-α para los estímulos LPS, LPS + sIgG o sIgG en células THP-1.....	55
6.9. Células THP-1 no aumentaron la producción de TNF-α cuando se co-estimularon con el ligando LPG de TLR2 + sIgG	59
6.10. La transcripción del gen de TNF-α aumentó en células THP-1 estimuladas con LPS + sIgG.....	60
6.11. La translocación de la subunidad p65 del factor de transcripción NF-κB aumentó en células THP-1 cuando se co-estimularon con LPS + sIgG	62
6.12. La fosforilación de la subunidad p65 de NF-κB aumentó cuando las células THP-1 fueron co-estimuladas con LPS + sIgG.....	63
6.13. IκB-α se degradó más rápidamente cuando las células THP-1 fueron co-estimuladas con LPS + sIgG.....	65
6.14. Inhibidores farmacológicos de las cinasas IRAK-1/4, Syk y Akt disminuyeron la producción de TNF-α en células THP-1 que fueron estimuladas con LPS o co-estimuladas con LPS + sIgG.....	66
6.15. Resultados no publicados.....	70
7. Discusión	73
8. Conclusiones	93
9. Perspectivas	94
10. Referencias	95
11. Publicación principal	115
12. Anexo: Primer proyecto y otras publicaciones	116

Índice de figuras

Figura I-1. Estructura del lípido A de <i>Escherichia coli</i>	12
Figura I-2. Reconocimiento de LPS.....	13
Figura I-3. Vías de señalización de TLR4.....	16
Figura I-4. Estructura de IgG	19
Figura I-5. La diversidad de los anticuerpos	20
Figura I-6. Los Fc γ Rs humanos de Tipo I	22
Figura I-7. Vías de señalización de Fc γ Rs.....	24
Figura 1. Análisis cromatográfico de IgG	43
Figura 2. Inmunofenotipo de células mononucleares (CMN) de sangre periférica	45
Figura 3. Linfocitos y monocitos en CMN de sangre periférica.....	47
Figura 4. Respuesta a LPS de monocitos y linfocitos en CMN de sangre periférica	48
Figura 5. Curva dosis-respuesta para sIgG en monocitos	49
Figura 6. Producción de TNF- α de monocitos en respuesta a LPS + sIgG y P3C + sIgG	50
Figura 7. Acumulación intracelular de TNF- α en monocitos como respuesta a la co-estimulación con LPS + sIgG o P3C + sIgG	52
Figura 8. Inmunofenotipo de monocitos de la línea celular THP-1	54
Figura 9. Curvas de dosis-respuesta para la producción de TNF- α por células THP-1 en sobrenadantes a las 12 h	55
Figura 10. Aumento en la producción de TNF- α por células THP-1	57
Figura 11. Curva dosis-respuesta para células THP-1 por acumulación intracelular de TNF- α	58
Figura 12. Acumulación intracelular de TNF- α de células THP-1 en respuesta a LPS + sIgG y LPG + sIgG.....	60
Figura 13. Curso temporal de la transcripción del gen de TNF- α en células THP-1 tras la co-estimulación con LPS + sIgG.	61
Figura 14. Aumento de la acumulación nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B en células THP-1 en respuesta a la estimulación con LPS + sIgG	62

Figura 15. La co-estimulación de células THP-1 con LPS + sIgG aumentó la fosforilación de la subunidad p65 de NF- κ B.....	64
Figura 16. La coestimulación con LPS + sIgG en células THP-1 causa más degradación de I κ B- α	65
Figura 17. El inhibidor de IRAK-1 e IRAK-4 inhibió la producción de TNF- α en células THP-1 que fueron estimuladas con LPS o co-estimuladas con LPS + sIgG	67
Figura 18. Los inhibidores de Syk y Akt inhibieron la producción de TNF- α en células THP-1 que fueron estimuladas con LPS o co-estimuladas con LPS + sIgG	69
Figura P-1. Akt se activa durante la coestimulación LPS + sIgG en células THP-1	70
Figura P-2. Transcripción de TNF- α en células THP-1 en presencia de diferentes siRNAs.....	72

Resumen

El LPS es un componente de la pared celular de bacterias Gram negativas e induce la producción de citocinas inflamatorias como TNF- α y otros mediadores de la respuesta inmune innata. El complejo receptor para LPS en el monocito lo conforman CD14, TLR4 (el receptor principal), MD2 y otras proteínas asociadas como CD55, CD11b/CD18, CD47, proteínas de choque térmico HSP 70/90 y los receptores para Fc de IgG (Fc γ Rs) CD64, CD32 y CD16; estos últimos se han encontrado también en el complejo ya activado por LPS. Se sabe que complejos inmunes formados por IgG inducen la producción de citocinas inflamatorias mediante los receptores Fc γ Rs, pero no se sabe lo que ocurre con IgG soluble que no se encuentra formando complejos inmunes. **Objetivo:** Describir y valorar la importancia de la IgG soluble (sIgG) en la producción de TNF- α inducido por LPS en células monocíticas humanas. **Métodos:** Hicimos un seguimiento temporal de la producción de TNF- α en células monocíticas humanas (células mononucleares CD14+, células mononucleares adherentes y línea celular THP-1) co-estimuladas con LPS + sIgG y con ligandos de TLR2 + sIgG. Mediante ELISA determinamos la producción de TNF- α a las 12 horas; medimos la acumulación intracelular de TNF- α a las 5 horas usando citometría de flujo; cuantificamos con qPCR el ARNm de TNF- α en la primera hora; medimos la acumulación intranuclear del factor de transcripción NF- κ B por citometría de flujo en los primeros 30 minutos; determinamos la fosforilación de NF- κ Bp65 y la degradación de I κ B- α por Western Blot en los primeros 10 minutos; y finalmente, inhibimos farmacológicamente a las cinasas IRAK1/4 y SYK que participan en la señalización de la producción de TNF- α . **Resultados:** La producción de TNF- α en células monocíticas humanas aumenta 30% al co-estimular con LPS + sIgG comparado con estimular solo con LPS; lo cual no sucedió al co-estimular con ligandos de TLR2 + sIgG y cuando se estimula solo con la sIgG no se observa producción de TNF- α . La coestimulación con LPS + sIgG afectó la vía de señalización de NF- κ B (aumento en la fosforilación y translocación nuclear de NF- κ Bp65 y la degradación acelerada de I κ B- α). El aumento en el ARNm de TNF- α al coestimular con LPS + sIgG fue de 2.5 veces comparado con estimular con LPS y únicamente en estos experimentos detectamos efecto al estimular solo con sIgG, siendo este del 56% del ARNm de TNF- α producido al estimular con LPS. La inhibición farmacológica de las cinasas IRAK1/4 y SYK suprimió el aumento en la producción de TNF- α al coestimular con LPS + sIgG.

1. Introducción

1.1. De la inmunidad innata y los receptores TLRs

El reconocimiento de los componentes moleculares propios y extraños es la piedra angular de la respuesta inmune [1]. El reconocimiento temprano de algunos microorganismos invasores por parte de las células del sistema inmune se realiza principalmente a través de monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos que expresan receptores de reconocimiento de patrones o PRRs capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs, que están presentes en los microorganismos [2].

Los PAMPs se caracterizan por ser prácticamente invariantes entre clases enteras de patógenos y son esenciales para la supervivencia de los mismos. El reconocimiento efectivo de los PAMPs por los PRRs constituye una parte fundamental de la inmunidad innata, que se caracteriza por ser rápida, por no requerir de una exposición previa a los patógenos y desencadena complejas vías de señalización que culminan en respuestas inflamatorias mediadas por varias citocinas y quimiocinas que favorecen la erradicación de los patógenos en un primer momento de la respuesta inmunitaria [3].

Se conocen cinco tipos de receptores PRRs (clasificados en base a su semejanza estructural y funcional); los primeros en describirse y los que más se han estudiado son los receptores tipo Toll (TLRs) [4].

El grupo de receptores tipo Toll en humanos está conformado por diez miembros, cuatro de ellos se expresan intracelularmente en endosomas (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9) y seis receptores son de membrana celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10) [5], su función combinada lleva al reconocimiento de muchos PAMPs de microorganismos intracelulares y extracelulares.

La región citoplasmática de los TLRs muestra una gran similitud con la de la familia de receptores de interleucina 1 (IL-1) y a este dominio se le conoce como dominio del receptor Toll/IL-1 (TIR), pero a pesar de esta similitud, las regiones extracelulares de ambos receptores no están relacionadas estructuralmente [6].

1.2. Del receptor TLR4 y el reconocimiento de LPS

El miembro más estudiado de la familia de los TLRs es el receptor TLR4, el cual reconoce a muchos ligandos diferentes, entre los más estudiados se encuentran los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas, las cuales pueden llegar a tener hasta 3.5×10^6 moléculas de LPS en su membrana externa [7].

La región inmunogénica del LPS se denomina lípido A (reconocido por TLR4), figura I-1, pero cuando el LPS está anclado dentro de la membrana externa bacteriana no se puede reconocer esta región. Cuando se libera el LPS a causa del crecimiento o de la lisis bacteriana, el lípido A queda expuesto e inicia una respuesta inmunitaria [8].

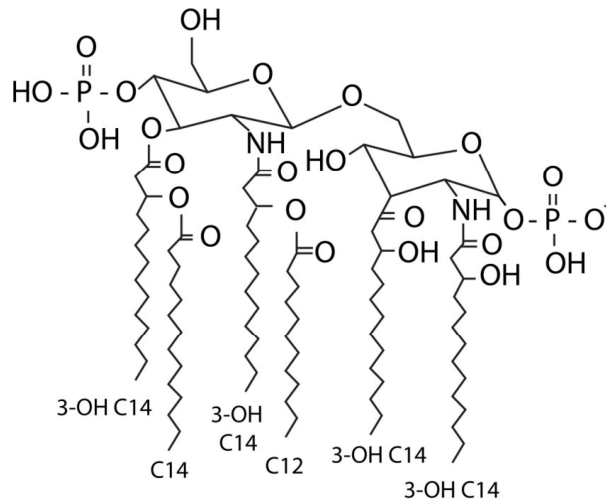



Figura I-1. Estructura del lípido A de *Escherichia coli*. Región inmunogénica conservada del lipopolisacárido LPS, considerado como uno de los PAMP más potentes que activan al sistema inmunitario innato. Imagen tomada de [7] que tiene licencia de acceso libre Creative Commons CC BY 3.0 

<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.es>

El reconocimiento de LPS en el lípido A comienza con su unión a la proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP), luego LBP cataliza la transferencia de LPS a CD14 [9], que es correceptor de LPS; CD14 está unido a la membrana celular a través de un GPI (glicosil-fosfatidilinositol) y se expresa en monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. CD14 se une a los complejos LPS-LBP y debido a que carece de dominios transmembranales o citoplasmáticos, se cree que no señala por sí mismo, pero sí potencia el reconocimiento de LPS [10].

La activación de vías de señalización la realiza el receptor TLR4 que se encuentra a su vez en un complejo con la proteína de diferenciación mieloide 2 (MD-2), observable en la figura I-2. Así pues, el sistema membranar de reconocimiento del LPS está formado por el complejo multiprotéico CD14-TLR4-MD-2, donde MD-2 es la proteína que se une directamente a la región homofóbica del fragmento de lípido A del LPS, figura I-1, y quedando la región hidrofílica de los grupos fosfato del lípido A hacia el receptor TLR4 [11–13].

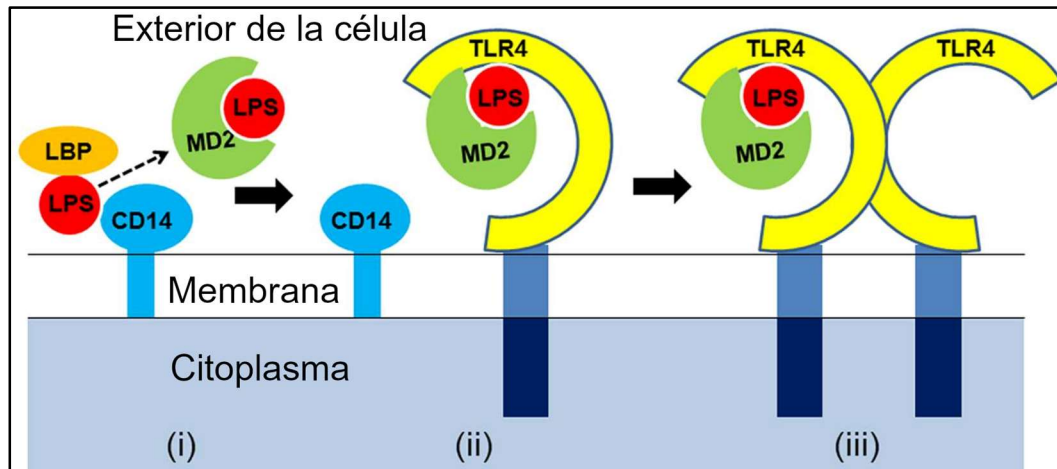


Figura I-2. Reconocimiento de LPS. El LPS se transfiere a MD-2 desde el complejo de reconocimiento CD14-LBP-LPS (i), esto produce la conjugación de LPS-MD-2 con TLR4 (ii) lo que conduce a la dimerización de TLR4-MD-2 y la formación del complejo TLR4-MD-2-LPS (iii). Imagen tomada de [14] que tiene licencia de acceso libre Creative Commons CC BY 3.0 . <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.es>

Tras la unión de LPS al complejo CD14-TLR4-MD-2, se produce su dimerización que conduce al reclutamiento de moléculas adaptadoras por medio de los dominios TIR de TLR4, iniciando así una cascada de señalización que activa al factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) y conduce a la producción de citocinas proinflamatorias, como IL-6 y el factor de necrosis tumoral α o TNF- α , entre muchas otras, dependiendo del tipo celular [15].

1.3. De las funciones de TNF- α

El factor de necrosis tumoral α o TNF- α es una potente citocina proinflamatoria que desempeña un papel importante en el sistema inmunitario durante la

inflamación ya que ejerce efectos pleiotrópicos como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis en varios tipos de células. Además, TNF- α tiene una actividad citotóxica significativa que provoca la necrosis tumoral, también tiene homología estructural con la linfotoxina α ; y de estos dos hechos proviene el nombre de TNF- α [16, 17] .

El TNF- α está relacionado con la vasodilatación, los edemas, la fiebre, la adhesión de leucocitos, la producción de especies reactivas de oxígeno y la apoptosis [18, 19]. Sin embargo, la producción inadecuada o excesiva de TNF- α puede ser dañina y se ha reportado que provoca enfermedades como la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria intestinal, la artritis psoriásica, la psoriasis y la uveítis no infecciosa, entre otras; por lo tanto, el TNF- α puede clasificarse como un factor clave en el desarrollo patológico de estas enfermedades e incluso paradójicamente en la progresión de ciertos tipos de cáncer [20, 21].

El TNF- α se produce en grandes cantidades principalmente por monocitos, macrófagos y neutrófilos; sin embargo, también lo producen muchos otros tipos celulares como linfocitos B, células NK, células endoteliales, fibroblastos, células del músculo liso, cardiomiocitos, osteoclastos, osteoblastos, astrocitos, células dendríticas, células de la microglía, queratinocitos, adipocitos, células adrenocorticales, células cebadas (que lo almacenan preformado en sus gránulos) y células mesangiales [22, 23].

1.4. De la producción de TNF- α inducida por LPS

La producción de TNF- α se puede inducir por complejos inmunes, diversos ligandos PAMPs, como los ligandos de los receptores TLRs y entre estos, el LPS se considera como uno de los más potentes inductores de la producción de TNF- α , también se puede inducir su producción por el propio TNF- α mediante los receptores de TNF- α llamados TNFRs [24].

En la fase temprana de la respuesta a LPS (figura I-3), la señalización de su receptor TLR4 depende de MyD88 (proteína 88 de respuesta primaria mieloide) y hay evidencia que indica que es crucial para la expresión inducible de citocinas proinflamatorias [25], se requiere que MyD88 se una a la proteína TIRAP (proteína adaptadora que contiene dominios TIR) que es una proteína

adaptadora que une a TLR4 con MyD88 [26]; esta unión lleva a la activación de las cinasas IRAK-1 e IRAK-4 (cinasas 1 y 4 asociadas al receptor de IL-1) que a su vez estimulan la actividad de ligasa de ubiquitina E3 de TRAF6 (Factor 6 asociado al receptor de TNF) [27, 28]. La actividad de ligasa de ubiquitina E3 de TRAF6 induce su propia auto ubiquitinación en Lys63 y así conjuga las cadenas de ubiquitina y otras moléculas de señalización que están involucradas en la activación de una cinasa dependiente de ubiquitina llamada TAK1 (cinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante β , TGF- β) [29, 30].

Una vez activada, TAK1 forma un complejo con las proteínas TAB1, TAB2 y TAB3 (proteínas 1, 2 y 3 de unión a TAK1) y activa, corriente abajo, a las cinasas del complejo IKK (IKK α -IKK β -IKK γ) que fosforilan a los I κ Bs (inhibidores de NF- κ B), lo que lleva a su respectiva degradación por ubiquitinación en Lys48 y a la posterior activación de NF- κ B [31], que se transloca al núcleo e inicia la transcripción de una gran cantidad de genes de citocinas proinflamatorias, incluidos los que codifican para TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12p40 y COX-2 (ciclooxigenasa 2) [32].

Ahora bien, además de activar NF- κ B, TAK1 también fosforila y activa MAPKs (proteínas cinasas activadas por mitógeno) como ERK (cinasa regulada por señales extracelulares), JNK (cinasa de c-Jun N-terminal) y p38 que potencian todavía más la producción de citocinas proinflamatorias mediante el factor de transcripción AP-1 (proteína activadora 1) [33, 34], véase la figura I-3.

Cabe mencionar que el factor de transcripción NF- κ B es una familia compuesta por 5 proteínas: RelA (p65), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF- κ B1) y p100/p52 (NF- κ B2), que se asocian entre ellas formando homo o hetero dímeros hasta un total de unos 15 diferentes, de los cuales el heterodímero p65/p50 es el más abundante e involucrado en la señalización inducida por LPS [35, 36]. Estos dímeros, se mantienen inactivos en el citoplasma por su unión a la familia de inhibidores I κ Bs, de los cuales hay tres canónicos: I κ B- α , I κ B- β e I κ B- ϵ que son preferiblemente los blancos de la subunidad IKK β del complejo IKK y que se unen a diferentes tipos de dímeros de NF- κ B, siendo I κ B- α el que está más relacionado y más estudiado con la vía descrita previamente [37].

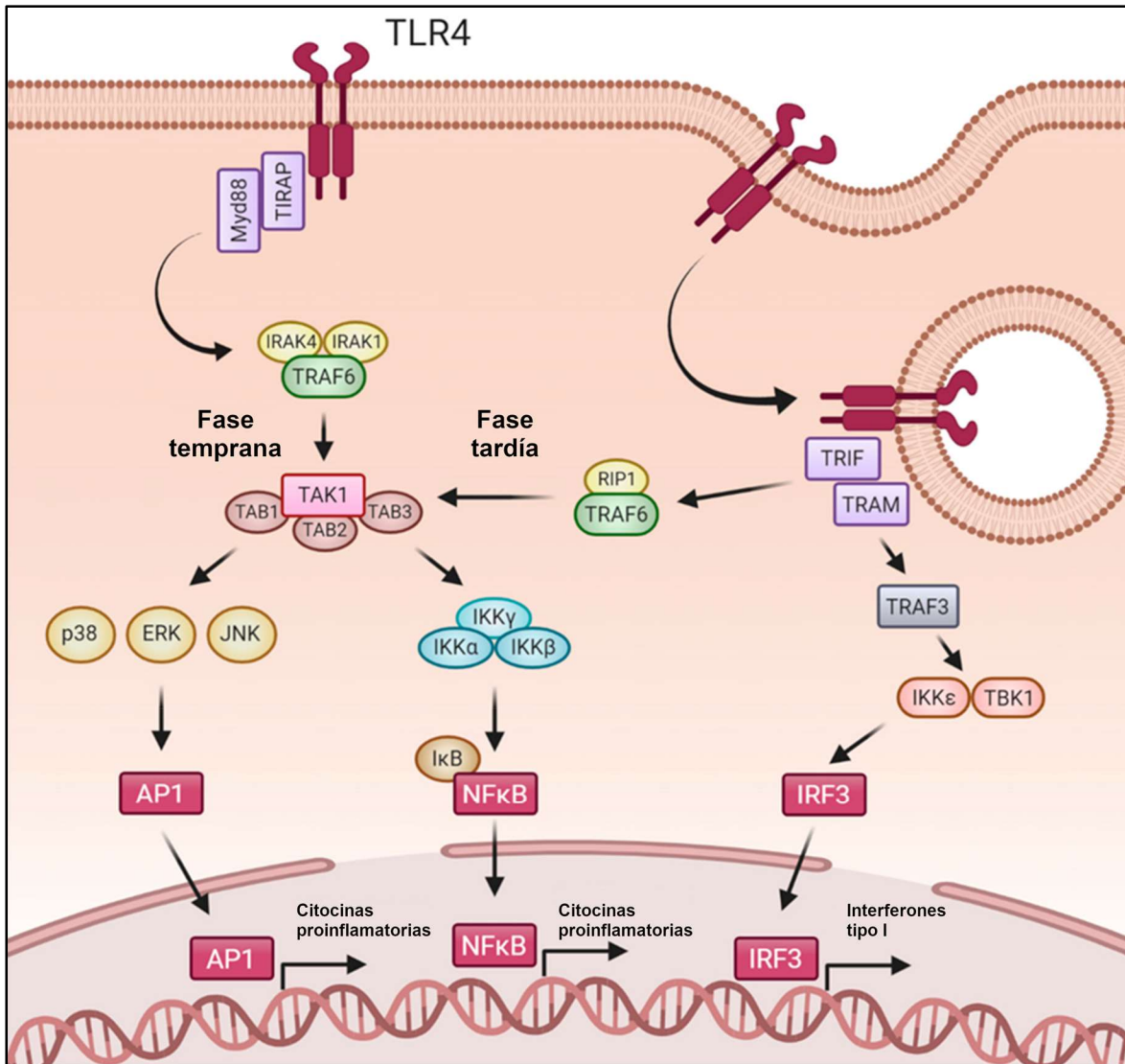



Figura I-3. Vías de señalización de TLR4. En la fase temprana de la activación de TLR4, la vía es dependiente de MyD88 y da como resultado la expresión de genes proinflamatorios vía NF-κB, también se activan las MAP cinasas ERK, Jnk y p38 que aumentan la expresión de citocinas proinflamatorias ahora por el factor de transcripción AP-1. Por otro lado, la vía independiente de MyD88 requiere del reclutamiento de TRIF y TRAM que sucede posterior a la internalización de TLR4 en endosomas, lo que induce la transcripción de IFNs de tipo I y genes inducibles por IFNs. Explicación detallada en el texto. Imagen tomada y modificada de [38] que tiene licencia de acceso libre Creative Commons CC BY 4.0 . <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>

Por otro lado, en la figura I-3 también se puede observar la fase tardía de la respuesta a LPS, ahora la señalización de TLR4 depende de TRIF (proteína

adaptadora con dominios TIR inductora de interferón β), y que sucede posterior a la endocitosis del complejo receptor de TLR4; esta vía induce la transcripción de genes de interferones (IFNs) de tipo I y otros genes inducibles por IFNs, esta vía involucra el reclutamiento de las proteínas adaptadoras TRIF, TRAM (proteína de membrana asociada a la translocación) y TRAF3 (factor 3 asociado al receptor de TNF) [39]; este reclutamiento lleva a la activación de TBK1, que es la cinasa 1 de unión a TANK (activador de NF- κ B asociado a miembros de la familia TRAF) y también a la activación de la cinasa IKK ϵ , en un mecanismo que se cree que involucra la ubiquitinación de TRAF3 y al reclutamiento dependiente de ubiquitina de TBK1 e IKK ϵ [40]. Las cinasas TBK1 e IKK ϵ activadas luego fosforilan al factor de transcripción IRF3 (factor 3 regulador de interferón) provocando su dimerización, lo que conduce a la transcripción de los genes de IFN de tipo I, IFN- α e IFN- β [25].

Además de la activación de IRF3, la vía de señalización de TLR4 dependiente de TRIF activa a NF- κ B a través de la estimulación de RIP1 (proteína adaptadora 1 que interactúa con receptores de cinasa) que se encuentra asociada con TRAF6 y que activa a TAK1 [2], véase la figura I-3.

1.5. De la inmunidad adaptativa y los anticuerpos

A diferencia de los receptores de reconocimiento PRRs que están codificados en el genoma, las respuestas inmunitarias adaptativas dependen de receptores que se seleccionan a través de procesos azarosos de recombinación somática de una gran variedad de segmentos de genes [41]. Las células del sistema inmunitario adaptativo incluyen a los linfocitos T, efectores de respuestas inmunitarias celulares que maduran en el timo, y los linfocitos B de la médula ósea, que, al activarse, proliferan y se diferencian en células plasmáticas, las responsables de producir anticuerpos [42, 43].

La vía de producción de anticuerpos comienza cuando el receptor de unión a antígeno de las células B (BCR) reconoce y se une a algún antígeno en su forma nativa. Las células Th secretan citocinas como la IL-6, que ayudan al linfocito B a multiplicarse y dirigir el tipo de anticuerpo que se producirá posteriormente al diferenciarse en células plasmáticas [43, 44].

Los anticuerpos secretados se unen a los antígenos en la superficie de los patógenos, marcándolos para su destrucción a través de la activación del

complemento, la promoción de la fagocitosis por opsonización y la eliminación de los patógenos por parte de las células efectoras inmunitarias como los monocitos, macrófagos o células dendríticas entre otras, tras la eliminación de los patógenos, la cascada del complemento elimina los complejos antígeno-anticuerpo [45].

Las células plasmáticas producen cinco tipos principales de anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig), que son: IgA (dimérica), IgD (monomérica), IgE (monomérica), IgG (monomérica) e IgM (pentamérica y la primera en producirse). En particular, la IgG es el principal anticuerpo producido durante la respuesta inmunitaria secundaria, es el único capaz de atravesar la barrera placentaria, interviene en la neutralización de toxinas y virus, tiene la capacidad de opsonizar (recubrir) antígenos e incluso patógenos completos para su eliminación por células fagocíticas y puede fijar y activar al sistema del complemento [46–48].

1.6. De la diversidad y estructura de los anticuerpos

La diversidad de los anticuerpos es una consecuencia de la configuración germinal de los genes que codifican las cadenas ligeras o pesadas de las inmunoglobulinas, las regiones que codifican para las regiones variables están compuestas de dos o tres juegos de secuencias, que gracias a un proceso de recombinación genética dan origen a una combinación particular, siendo las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) las que hacen único a cada anticuerpo, ya que estas regiones hipervariables son las responsables de la especificidad de cada anticuerpo [49].

Los anticuerpos pueden ser escindidos por proteasas, como la papaína que rompe la IgG en tres fragmentos, un fragmento Fc y dos fragmentos Fab idénticos [50]. Esta proteólisis permitió demostrar que la capacidad de reconocimiento se encuentra en el fragmento Fab. Por otra parte, en el fragmento Fc se encuentra la información para asociarse con moléculas efectoras como las del sistema de complemento o su unión a receptores específicos denominados receptores Fc de IgG (FcγRs) que son expresados en una diversidad de células efectoras del sistema inmune permitiendo la fagocitosis de microorganismos o incluso recubrir células completamente por complejos antígeno-anticuerpo [51].

Los anticuerpos se componen de inmunoglobulina (Ig), la cual tiene una estructura globular con dominios característicos que asemejan una "Y" (~150 kDa), y es en realidad un tetrámero que consta de dos cadenas ligeras (L, del inglés light) y dos cadenas pesadas (H, del inglés heavy) [52], como se observa en la figura I-4, que representa al isotipo IgG:

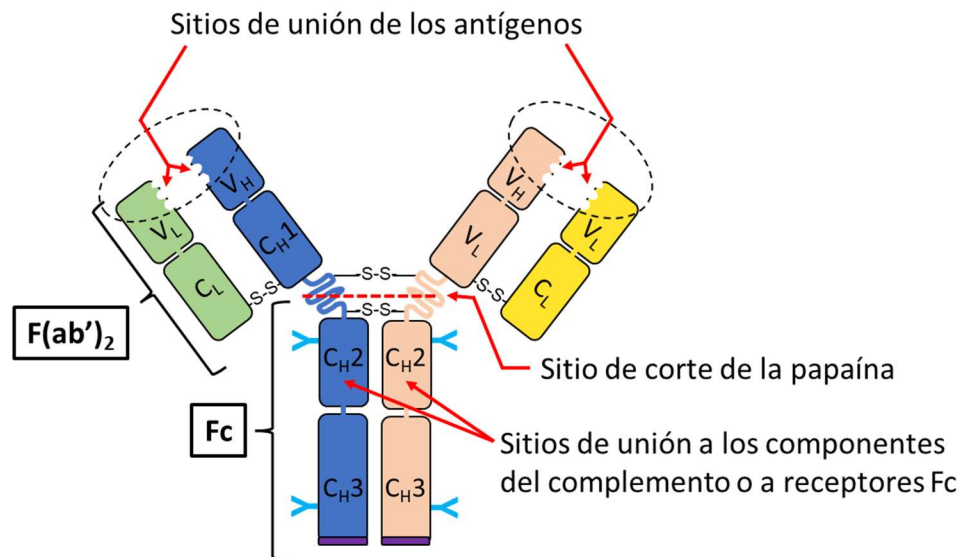



Figura I-4. Estructura de IgG. *Los anticuerpos/inmunoglobulinas constan de dos cadenas pesadas H (azul y carne) y dos cadenas ligeras L (verde y amarillo). Las dos regiones de unión al antígeno están marcadas con un círculo: están formadas por las regiones variables en la punta del anticuerpo. Las cadenas pesadas tienen (empezando del extremo N-terminal) un dominio variable (V_H), seguido de un dominio constante (C_{H1}), una región de bisagra y dos dominios constantes más (C_{H2}, C_{H3}). Las cadenas ligeras tienen un dominio variable (V_L) y un dominio constante (C_L). Cada cadena pesada está unida a una cadena ligera por medio de un puente disulfuro, mientras que las dos cadenas pesadas están unidas por dos puentes disulfuro. Imagen tomada y modificada de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Antibody_basic_unit.svg que tiene licencia de acceso libre Creative Commons CC BY-SA 4.0 . <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.es>*

Las cadenas pesadas de los anticuerpos presentan una región variable que se genera por la edición de 3 juegos de secuencias denominadas: V_H, D_H y J_H (V: variable; D: diversidad; J: unión, del inglés junction). En cambio, la región variable de las cadenas ligeras se genera por edición de 2 juegos de secuencias: V_L y J_L. La combinatoria de estas secuencias permite generar cerca de 10¹⁰ combinaciones de diferentes secuencias variables.

Esta diversidad se incrementa aún más por procesos moleculares como la hipermutación somática que altera la secuencia de la región hipervariable añadiendo un número variable y azaroso de nucleótidos. Más aún, la eficiencia de cada anticuerpo se pone a prueba en los centros germinales donde se seleccionan sólo aquellos anticuerpos que poseen mayor afinidad por sus antígenos. Todo esto genera una diversidad mucho mayor de la que se genera por la simple recombinación de las secuencias V, D y J (figura I-5).

Finalmente, es importante subrayar que estos eventos de recombinación genética e hipermutación ocurren en células individuales que maduran y son seleccionadas dando origen a una sola clona de célula plasmática responsable de generar un solo tipo de anticuerpo [53].

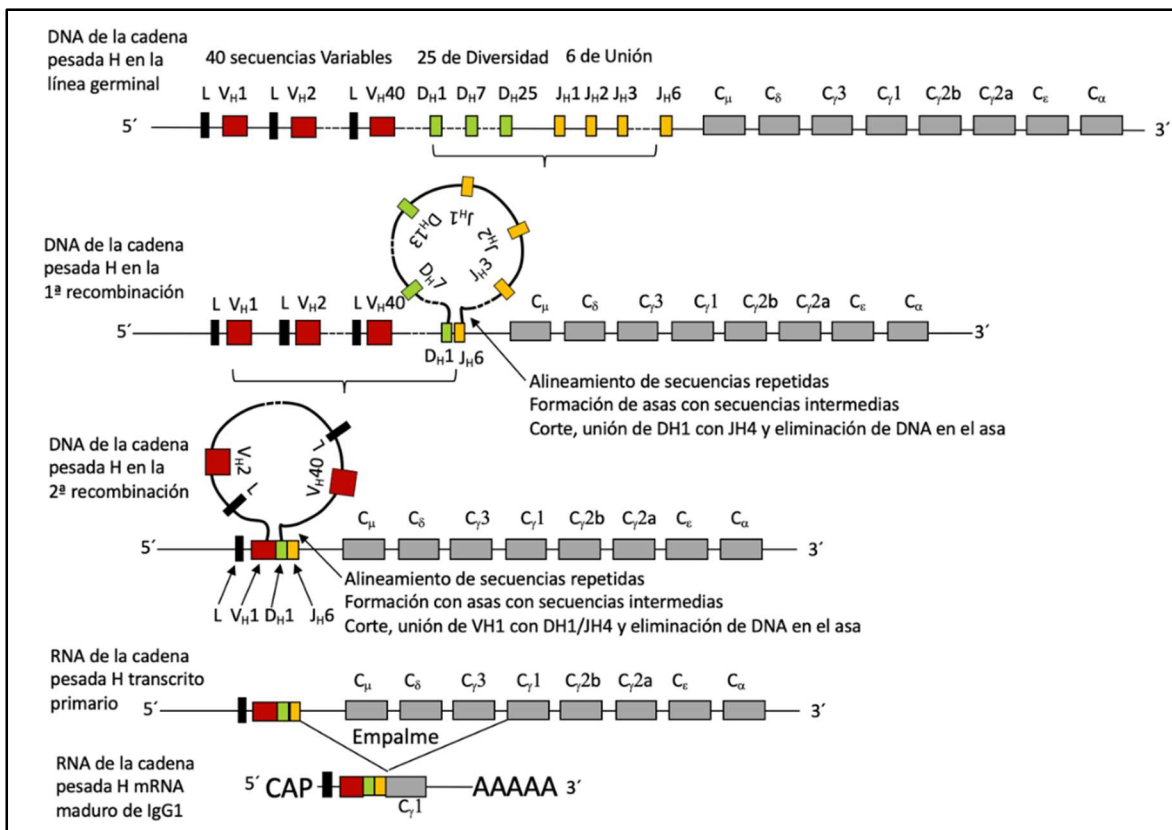


Figura I-5. La diversidad de los anticuerpos. La diversidad de la región hipervariable en los anticuerpos se genera a nivel genómico e inicia por seleccionar uno de los tres elementos V (variable), D (diversidad) y J (unión, del inglés junction) a través de un mecanismo de hibridación, corte y ligamiento. Una vez que se seleccionan los dos primeros elementos (DH1 y JH6) la recombinación se repite para seleccionar un elemento V(variable), en este ejemplo VH1. El resultado es un gen de la cadena pesada editado que

presenta una combinación VDJ particular. Cuando las células ingresan a los centros germinales se introducen mutaciones en la región hipervariable. La selección del isotipo de la región constante (“switch” de isotipo) se da por medio de un empalme alternativo, en este ejemplo se selecciona el isotipo IgG1. De esta manera la misma combinación (V_{H1}/D_{H1}/J_{H6}) puede emplearse para generar anticuerpos de cualquier isotipo [53].

1.7. Del estado conformacional de IgG

La IgG es el isotipo de inmunoglobulina dominante en infecciones crónicas y en enfermedades autoinmunes mediadas por anticuerpos y se puede encontrar en diferentes estados conformacionales, formando complejos inmunes, en forma monomérica o en multímeros.

Cuando la IgG se une a su antígeno, se forman complejos inmunes (IC) que se unen a sus células efectoras que, dependiendo del antígeno, son insolubles (iIC) o solubles (sIC) [54].

La composición de los sIC depende de la cantidad de epítopos reconocidos por IgG en una sola molécula de antígeno y la capacidad del antígeno para formar multímeros. También se sugiere que los cambios en los tamaños de los sIC impactan directamente en las respuestas de los Fc γ Rs [55].

La abrumadora mayoría de estudios sobre los efectos de los anticuerpos están relacionados a su conformación como complejos inmunes, y se han usado modelos de agregación por calor HA-IgG que simulan a los ICs [56].

Incluso, se creía que la activación celular no se producía por la unión de anticuerpos monoméricos, sino que dependía de la unión de múltiples fragmentos Fc de anticuerpos presentes solo en los complejos inmunes, que entonces serían los activadores fisiológicos de las células efectoras inmunitarias innatas, aunque se sabía de la capacidad de unión de IgG monomérica al receptor de alta afinidad Fc γ RI o CD64 [57, 58].

Particularmente, se ha descrito que altas dosis de IgG intravenosa, que es principalmente monomérica y no forma complejos inmunes, tiene efectos antiinflamatorios, que aún siguen siendo investigados [59]. Por lo que el estado conformacional de IgG se considera relevante y se sugiere que es distinto entre complejos inmunes e IgG monomérica.

1.8. De los receptores de Fc de IgG (FcγRs)

La afinidad y la especificidad de unión del dominio Fc para diferentes FcγRs está determinada por diferencias en la secuencia de aminoácidos de los subtipos de IgG (IgG1-IgG4), así como por la estructura y composición glucosídica asociada a Fc. Estos dos determinantes impulsan la diversificación del dominio Fc, lo que da como resultado dominios Fc de IgG con diferentes capacidades para acoplarse y activar los diversos miembros de la familia FcγRs expresados por los leucocitos efectores [60].

Los receptores de Fc se clasifican en los de tipo I y tipo II, según el estado conformacional del dominio Fc que interactúa con el receptor. Los receptores de Fc de tipo I interactúan con la conformación abierta del dominio Fc, pero no con la conformación cerrada como lo hacen los receptores de Fc de tipo II [61].

Los FcγRs canónicos de tipo I humanos constituyen una familia formada por 6 miembros: FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32a), FcγRIIb (CD32b), FcγRIIc (CD32c), FcγRIIIa (CD16a) y FcγRIIIb (CD16b), figura I-6. Estos receptores son capaces de reconocer tanto IgG monomérica como complejos inmunes de IgG asociados a antígenos o asociados a la opsonización de microorganismos [58].

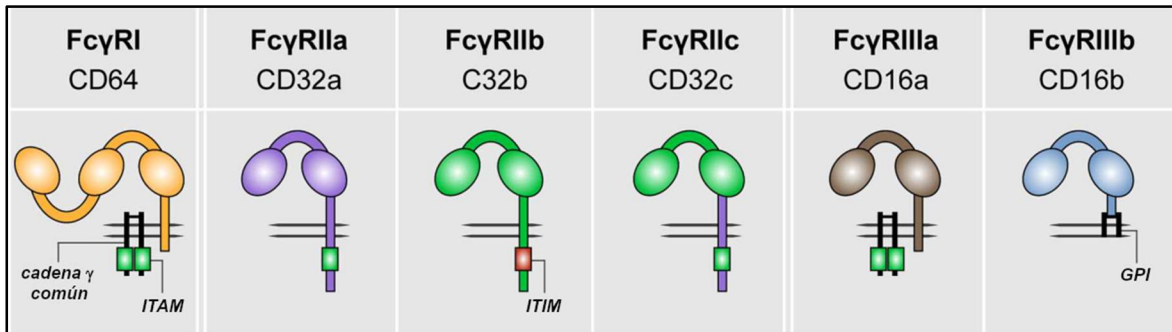



Figura I-6. Los FcγRs humanos de Tipo I. Los FcγRs humanos se dividen en tres tipos: FcγRI, FcγRII y FcγRIII. Estos receptores se pueden agrupar por función (FcγRIIb es el único receptor inhibidor) o por afinidad por IgG (FcγRI es el único receptor de alta afinidad). Imagen tomada y modificada de [62] que tiene licencia de acceso libre Creative Commons CC BY 4.0 . <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>

La mayoría de los Fc γ Rs (CD64, CD32a, CD32c y CD16a) pueden inducir señales de activación después de unirse a Fc de IgG porque los dominios intracelulares de sus cadenas γ tienen motivos de activación llamados ITAM (motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina) que son necesarios para la señalización de los Fc γ Rs. Las funciones mediadas por ITAM incluyen fagocitosis, desgranulación, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), secreción de citocinas y mediadores lipídicos, y producción de superóxido, todo lo cual depende del tipo de célula y de las señales externas inducidas por el ligando [63].

En el caso del receptor Fc γ RIIIb (CD16b), se expresa como una proteína anclada a GPI y, por lo tanto, es incapaz de transducir señales; sin embargo, CD16b aún tiene la capacidad de transducir señales de activación luego del entrecruzamiento del receptor, principalmente al asociarse y actuar sinérgicamente con receptores activadores como CD32a [64, 65]. Por el contrario, Fc γ RIIb o CD32b representa el único Fc γ R inhibidor, mediando la actividad de señalización a través de un motivo inhibidor de inmunorreceptor basado en tirosina o ITIM presente en su región citoplásmica, figura I-6 [66].

1.9. De las vías de señalización de los receptores Fc γ Rs

La activación de los Fc γ Rs por complejos inmunes induce la agregación de los receptores, seguida de la activación y el reclutamiento de cinasas de la familia Src, como Lyn y Fyn, que inducen la fosforilación de las tirosinas conservadas en los motivos ITAM, que lleva a la activación y reclutamiento de la tirosina cinasa Syk. La cinasa Syk fosforila directamente a la proteína adaptadora SLP65 que une y activa a varias proteínas involucradas en la respuesta celular, como la fosfolipasa C gamma 1 (PLC γ), la tirosina cinasa de Bruton (Btk) y la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) [67, 68].

La hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) por PLC γ genera inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) que conducen a la movilización de calcio y la activación de la proteína cinasa C (PKC), respectivamente. El flujo de calcio y la activación de PKC promueven respuestas celulares como la desgranulación y la producción de citocinas. La PI3K cataliza la fosforilación de PIP2 en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) en la membrana plasmática. Los dominios de homología de pleckstrina contenidos en proteínas como PLC γ ,

proteína cinasa B (PKB/Akt) y Btk, se unen a PIP3, reclutándolos así en la región intracelular de la membrana celular y promoviendo su fosforilación y activación (figura I-7, izquierda) [69, 70].

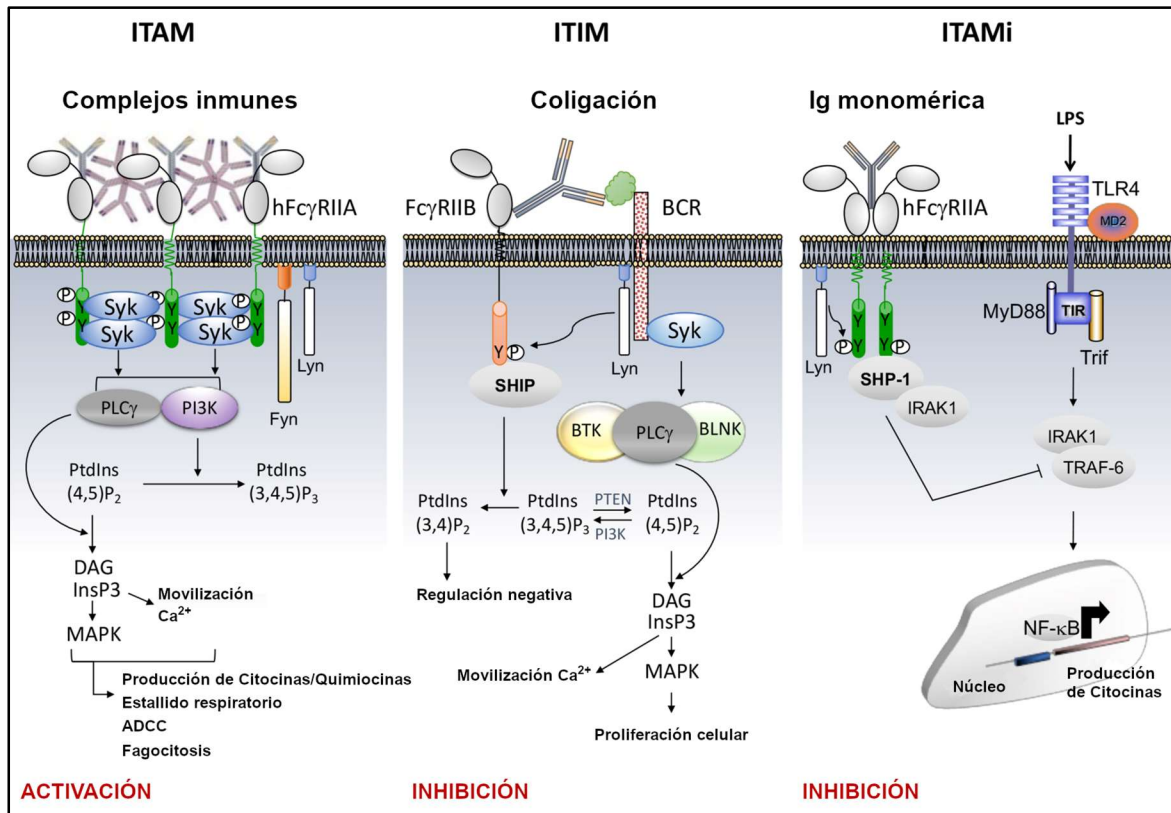


Figura I-7. Vías de señalización de FcγRs. *Izquierda:* Proceso de activación dependiente de FcγRs con motivo ITAM (ejemplo, hFcγRIIa) por complejos inmunes, la cascada de señalización depende de las cinasas Syk y PI3K que finalmente termina con la producción de citocinas/quimiocinas, liberación de especies reactivas de oxígeno y los procesos ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) y fagocitosis. **En medio:** Proceso de inhibición mediado por FcγRIIb con motivo ITIM por coligación con un receptor heterólogo (ejemplo, BCR) que induce el reclutamiento de fosfatasa (SHIP o SHP) que inhiben las vías de señalización dependientes de PI3K. **Derecha:** la activación de FcγR (ejemplo, hFcγRIIA) con dominio ITAM que inhibe la producción de citocinas mediada por LPS-TLR4. Explicación detallada en el texto. Imagen tomada y modificada de [70] que tiene licencia de acceso libre Creative Commons CC BY 4.0 <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>

La activación dependiente de motivos ITAM pueden controlarse mediante el receptor inhibitorio FcγRIIb, único portador del motivo inhibitorio ITIM. La

inhibición de la activación celular por este motivo requiere la coligación mediada por complejos inmunes entre Fc γ RIIb y algún receptor activador como el receptor antigénico de linfocitos B o BCR que promueve el reclutamiento de las fosfatasa de inositol SHIP-1 y SHIP-2. Estas convierten PIP3 en PIP2, deteniendo así las vías mediadas por los Fc γ Rs activadores (figura I-7, en medio) [66, 70].

Recientemente se ha identificado otro mecanismo inhibidor que involucra a los propios motivos ITAM. De hecho, después de interacciones de ligandos de baja avidéz, los Fc γ Rs que están asociados a los motivos ITAM inducen señales inhibitorias sostenidas sin coligación con otros receptores, este mecanismo está involucrado en la homeostasis inmune [71]; al ser una señal inhibitoria mediada por ITAM, se le llama ITAMi al motivo. Se ha demostrado que varios receptores de baja afinidad, como Fc γ RIIA y Fc γ RIIIA pueden funcionar como receptores bifuncionales para inducir señales de activación o inhibición, una propiedad que puede aprovecharse para reducir la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes e inflamatorias. La activación de los Fc γ R que portan un motivo ITAMi se asocian con un mecanismo de acción de IgG monomérica e induce señales inhibitorias que implican la activación y el reclutamiento de la fosfatasa SHP-1 (figura I-7, derecha) [70, 72].

1.10. De la relación entre TLR4 y Fc γ Rs

En este trabajo evaluaremos los efectos de LPS y sIgG, y para el entendimiento de estos efectos es necesario conocer de las interacciones entre la señalización de sus receptores, TLR4 y Fc γ Rs respectivamente. El control de la respuesta inmune es muy complejo, se ha sugerido que las respuestas inmunitarias adaptativas están controladas por el reconocimiento del sistema inmune innato y viceversa; en particular, los TLRs y los Fc γ Rs son considerados importantes reguladores de las respuestas inmunitarias [73].

Los receptores para LPS: CD14 y TLR4; y los receptores para Fc de IgG: CD64, CD32a, CD32b y CD16 son parte de las proteínas que expresan las células del linaje monocítico y en conjunto se consideran como marcadores de superficie de estas células [58, 74], además existe evidencia de relaciones cruzadas entre las vías de señalización de TLR4 y Fc γ Rs. Es importante señalar que esa comunicación cruzada funciona a diversos niveles, desde la asociación hasta la

interacción entre estas dos familias de receptores; a continuación, mencionamos algunos ejemplos de esto.

A nivel de asociación de proteínas, se ha demostrado por la técnica de FRET (transferencia de energía de resonancia por fluorescencia), que en el monocito en reposo, CD14 se encuentra en balsas lipídicas asociadas a HSP70/90 (proteínas de choque térmico 70 y 90), CXCR4 (receptor 4 de quimiocina CX) y GDF5 (factor de diferenciación de crecimiento 5) [75], CD55, CD47 y a los receptores FcγRs CD64 y CD32; sin embargo, interesantemente cuando se agrega LPS al cultivo celular, el complejo multiprotéico libera a CD47 e incorpora al FcγR CD16 y a TLR4 [76, 77]. También se ha observado que el bloqueo de la dimerización de TLR4 (necesaria para la señalización) anula la asociación dependiente de LPS con FcγRI o FcγRIIIa en balsas lipídicas [78].

En otra serie de experimentos de asociación de proteínas, se observó que los receptores FcγRII y FcγRIII coinmunoprecipitan con TLR4 cuando se activan macrófagos con LPS + complejos inmunes de IgG, indicando que los FcγRs podrían estar haciendo heterodímeros con TLR4 [79]. También, la cinasa Syk, involucrada en la señalización de los FcγRs, coinmunoprecipita con TLR4 en monocitos, macrófagos y neutrófilos incluso sin haber estimulado con LPS, por lo que algunos autores consideran ahora a Syk como parte constitutiva del complejo TLR4, receptor de LPS [80].

A nivel de señalización, se ha reportado que el entrecruzamiento del receptor CD16 en monocitos desencadena la expresión de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-1 β con los mismos elementos transduccionales que los que induce el LPS mediante TLR4 [81, 82]. Adicionalmente, se tienen reportes de que complejos inmunes de IgG con fibrinógeno citrulinado activan a FcγRIIIa y TLR4 en macrófagos aumentando la producción de TNF- α [83].

En modelos experimentales de sepsis en ratones, la deficiencia de FcγRs permite la sobrevivencia de los mismos, al disminuirse la producción de citocinas proinflamatorias inducidas por LPS mediante TLR4 [84].

A nivel clínico, se ha mostrado que el aumento de monocitos CD14⁺ CD16⁺ (correceptor de LPS y FcγRIII respectivamente) de pacientes con sepsis aumentan la producción de TNF- α de manera sinérgica con TLR4 mediante el aumento de la fosforilación de la cinasa Syk (que es importante en la señalización mediada por FcγRs) [85, 86]. En experimentos de hemoperfusión con fibras

inmovilizadas de polimixina B (potente antibiótico que se une a LPS y lo inactiva imposibilitando su unión a TLR4) reduce el número de monocitos CD14+ CD16+ en pacientes con sepsis [87]. En pacientes con artritis reumatoide quiescente FcγRIIb disminuye el efecto de las respuestas inducidas por TLR4 [88].

Por todos los estudios mencionados anteriormente, en el laboratorio entendimos que existe una relación estrecha entre el complejo receptor TLR4 y los receptores FcγRs, esta relación es necesaria para el planteamiento del problema de la tesis, ya que en nuestros experimentos utilizaríamos los ligandos de ambos grupos de receptores, LPS e IgG respectivamente.

2. Planteamiento del problema

El efecto que tiene la IgG en el sistema inmunológico es reportado en la literatura principalmente por causa de los complejos inmunes de IgG, los cuales se producen por la opsonización de diferentes estructuras celulares o, artificialmente, formando agregados por calor o por inmovilización de estructuras poliméricas de IgG recubriendo cajas de cultivo; y con respecto a los complejos inmunes, se requiere necesariamente de la interacción específica de IgG con su antígeno respectivo para formarlos [60, 89–91].

Varios estudios sugieren que la IgG que no forma complejos inmunes, mayormente IgG monomérica, no tiene efecto en la transducción de señales en la mayoría de los receptores Fc γ Rs (excepto para el receptor de alta afinidad CD64), y que su mecanismo de acción, por ejemplo, cuando se utiliza en altas concentraciones de manera intravenosa (IgG IV), en pacientes con enfermedades autoinmunes, es saturando a los Fc γ Rs de los leucocitos, impidiendo de esta manera la unión de los complejos inmunes de IgG, que serían los verdaderos responsables de la señalización [59].

En nuestro grupo de investigación estuvimos interesados en estudiar las funciones de IgG monomérica, pero a falta de esta, utilizamos IgG soluble (sIgG, preparada a partir de la sangre de miles de donantes sanos), principalmente monomérica que, aunque contiene dímeros, no forma complejos inmunes y es equivalente a IgG IV, que se usa clínicamente, pero considerablemente más barata. Habíamos observado en experimentos previos en nuestro laboratorio que la sIgG aumentaba la producción de TNF- α inducida por LPS, en contradicción a lo publicado en estudios realizados con la sIgG clínica, IgG IV [92].

Por lo cual iniciamos la primera fase de este estudio, que es descriptivo en su mayoría y consiste en mostrar que sIgG modula la producción de TNF- α inducido por LPS específicamente (y no por otros ligandos, como de TLR2), que no es un artificio de las técnicas utilizadas, que es reproducible y que sucede en células monocíticas; lo cual realizamos mediante el análisis de distintos parámetros como la expresión, la transcripción y la activación de elementos transduccionales clásicos de la vía de señalización de TLR4.

3. Hipótesis

La IgG soluble (sIgG, preparada a partir de la sangre de miles de donantes sanos, que se encuentra de forma monomérica y dimérica, pero no forma complejos inmunes) es capaz de modular los niveles de producción de TNF- α inducida por LPS de manera específica (y no cuando la producción de TNF- α es inducida por otros ligandos, como el ligando peptidoglicano de TLR2) en células monocíticas humanas provenientes de CMN de sangre periférica y línea celular THP-1, y que el mecanismo de señalización está relacionado con los receptores de Fc de IgG.

4. Objetivo general

Investigar la importancia de los anticuerpos IgG solubles en la producción de TNF- α inducido específicamente por LPS en dos tipos de células monocíticas humanas: CMN de sangre periférica y línea celular THP-1.

4.1. Objetivos particulares

- Evaluar el estado conformacional de IgG (monomérica, dimérica o complejos inmunes) en la solución que utilizamos para los estímulos.
- Determinar el inmunofenotipo de receptores para LPS (CD14 y TLR4), del receptor TLR2 (también induce la producción de TNF- α) y para los receptores de Fc de IgG (CD64, CD32 Y CD16) en las células monocíticas humanas CMN de sangre periférica y la línea celular THP-1.
- Comprobar que subpoblaciones de CMN de sangre periférica responden a los estímulos de LPS y de sIgG.
- Realizar curvas de dosis-respuesta de producción de TNF- α en respuesta al LPS y a la sIgG en CMN de sangre periférica y línea celular THP-1.

- Evaluar si sIgG tiene efecto en la producción de TNF- α inducida por ligandos de TLR2 en células monocíticas humanas de CMN de sangre periférica y la línea celular THP-1.
- Determinar el nivel de producción de TNF- α en respuesta a LPS + sIgG en células monocíticas humanas de CMN de sangre periférica y la línea celular THP-1 por 2 metodologías distintas, detectando TNF- α en sobrenadantes a las 12 h por ELISA y con citometría de flujo midiendo la acumulación intracelular de TNF- α a las 5h.
- Determinar los niveles de transcripción del gen de TNF- α y el funcionamiento de la vía de activación del factor de transcripción NF- κ B, al coestimular a la línea celular THP-1 con LPS + sIgG.
- Utilizar inhibidores farmacológicos de cinasas involucradas en la señalización de TLR4 (IRAK1 e IRAK4) o de los Fc γ Rs (Syk y Akt) para determinar si existen cambios en el fenotipo observado en la línea celular THP-1 en respuesta al LPS y a la sIgG.

5. Materiales y métodos

5.1. Condiciones generales

Las células, medios de cultivo celular, suplementos para el crecimiento celular, reactivos y los demás materiales que se ocuparon en este trabajo fueron manipulados en condiciones de esterilidad con guantes en un cuarto de cultivo celular y utilizando una campana de seguridad biológica de flujo laminar (NuAire®, cat. NU-425-400; MA, USA).

Los medios y suplementos para el crecimiento celular junto con los reactivos fueron almacenados según las condiciones generales y de temperatura indicadas por cada fabricante.

Los materiales ocupados de plástico eran nuevos y los de vidrio reutilizados, estos últimos se esterilizaban mediante presión en autoclave o gas en la Central de Equipos y Esterilización (CEYE) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ; CDMX, MEX).

Las células se cultivaron en una incubadora (NuAire®, cat. NU-4500; MA, USA) con atmósfera humidificada y flujo de CO₂ ajustado en forma automática al 5% y a 37 °C. Se usó el microscopio óptico para verificar la integridad de las células con las que se trabajó.

El potenciómetro para medir el pH de las soluciones amortiguadoras utilizadas se calibró con dos soluciones patrón en el rango de pH que correspondiera, para posteriormente esterilizarlas por medio de sistemas de filtración estériles con filtros de 0.22 µm.

Las micropipetas utilizadas fueron manipuladas en condiciones de esterilidad y calibradas cada 3 meses por el Departamento de Ingeniería Biomédica del INCMNSZ.

5.2. Determinación del estado conformacional de sIgG

Se enviaron soluciones muestra de sIgG humana (Sigma-Aldrich®, cat. I4506; MO, USA) y de IgG IV TEGELINE® (LFB Biomedicaments®, cat. 103M2012SSAIV; Les Ulis, FRA) al laboratorio de Purificación de Proteínas por FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) e Identificación de Proteínas por Espectrofotometría de Masas de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI), Facultad de Química, UNAM; de donde se obtuvieron los cromatogramas correspondientes.

La técnica ocupada en el USAI fue la cromatografía líquida de filtración en gel (SEC, por sus siglas en inglés) y se utilizó un equipo automatizado de purificación de Proteínas (cromatógrafo de líquidos de baja presión FPLC, marca ÄKTA de General Electric (GE), modelo Avant 25) y una columna Superdex 200 pg 16/600 de 100 mL (GE Healthcare, cat. 18-1156-96, USA) con un intervalo de resolución molecular de 10 a 600 kDa; la concentración de la muestra fue de 1 mg/mL y se cargó 1 mL con un flujo de 0.5 mL/min y se utilizó para la fase móvil las siguientes fases, Fase A2: agua (lavado de la columna), Fase A1: PBS para sIgG humana Sigma-Aldrich® y RPMI para IgG IV TEGELINE® (equilibrado de la columna y elución de la muestra) y Fase B2: etanol al 20% en agua (almacenamiento de la columna).

5.3. Cultivo celular

Las células mononucleares (CMN) de sangre periférica se obtuvieron como se describe más adelante en el apartado 5.4 y se cultivaron en medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 que se hidrató a partir de sobres (Gibco®, cat. 17112959; MA, USA) y se suplementó con 10% v/v de suero fetal bovino, FBS (Gibco®, cat. 26140079; MA, USA) que se inactivó previamente por calor a 56 °C durante 30 min.

Adicionalmente, el medio se suplementó con una solución de antibiótico/antimicótico (Gibco®, cat. 11570486; MA, USA) con 10,000 U/mL de penicilina, 10,000 µg/mL de estreptomina y 25 µg/mL de antimicótico anfotericina B Fungizone®. Las células se cultivaron a una densidad inicial de 1×10^6 células/mL por 1 h, posteriormente se lavaron 3 veces con medio de

crecimiento sin FBS para retirar las CMN no adherentes y se volvió a agregar medio de crecimiento con SFB para continuar con los estímulos.

Por otro lado, la línea celular THP-1, que deriva de una leucemia monocítica aguda, se compró a la American Type Culture Collection (ATCC® cat. TIB-202; MD, USA) y se cultivó en RPMI-1640 suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino y con adición de una solución de antibiótico/antimicótico de la misma forma que para las CMN de sangre periférica descrita anteriormente y, siguiendo con las indicaciones de la ATCC, además, el medio se suplementó con 2 mM de L-glutamina, 2.5 g/L de glucosa, 1 mM de piruvato de sodio, 10 mM de HEPES y 0.05 mM de 2-mercaptoetanol.

El crecimiento celular se mantuvo a una densidad entre 0.1 y 1×10^6 células/mL como máximo. Las células se alimentaron y se subcultivaron dos veces por semana y se utilizaron solo hasta el pasaje 20 en cultivo.

Tanto las CMN de sangre periférica como la línea celular THP-1 se sembraron en botellas de cultivo estériles de 75 cm² de plástico NUNC® (Thermo Scientific®, cat. 156800; MA, USA) o placas estériles de plástico de 6, 12, 24 o 48 pozos Costar® (Corning®, cat. 10146810; NY, USA) dependiendo de si el objetivo era el cultivo celular, o la experimentación. Antes de cada experimento se verificó la viabilidad de las células en el microscopio, mediante tinción con azul de tripano.

5.4. Obtención de CMN de sangre periférica

Se aislaron CMN (células mononucleares) de sangre periférica a partir de los paquetes leucocitarios (buffy coats) presentes en fracciones de baja densidad de unidades de sangre donadas al banco de sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Las CMN de sangre periférica se separaron por centrifugación en gradiente de densidad de Lymphoprep® (AXIS-SHIELD®, cat. AXS-1115758; Oslo, NOR) por 30 min a 400 x g en tubos de fondo cónico de 50 mL (Corning®, cat. 10509891; NY, USA).

5.5. Estimulación celular

Las CMN de sangre periférica y las células THP-1 se sembraron a una densidad de 5×10^5 células/mL en placas de 24 pozos Costar® y se estimularon con diferentes concentraciones, en general 10 ng/mL, de LPS (ligando de TLR4) de *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich®, cat. L2630; MO, USA), y con 10 µg/mL u otras concentraciones de sIgG humana (Sigma-Aldrich®, cat. I4506; MO, USA), o con ambos estímulos a diferentes tiempos, desde 30 min hasta 12 h dependiendo del experimento.

Antes de utilizar el LPS o sIgG para la estimulación, y para evitar su agregación, se sonicaron ambas soluciones a 300 Hz durante 5 min en un sonicador con baño de agua Branson® (Branson/SmithKline, cat. B-52; CT, USA).

Para algunos experimentos, tanto con CMN de sangre periférica como con células THP-1, se utilizaron 2 ligandos diferentes de TLR2, el ligando sintético Pam3CSK4 (InvivoGen, cat. tlrl-pms; CA, USA) y el ligando natural lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania major* (donado por el Dr. Ingeborg Becker de la Facultad de Medicina de la UNAM; CDMX, MEX); ambos se utilizaron como estímulos a 1 µg/mL, tanto solos como en combinación con 10 µg/mL de sIgG humana.

Para los experimentos de tinción intracelular, tanto las CMN de sangre periférica como la línea celular THP-1 se incubaron con los estímulos respectivos y además con 10 µg/mL de Brefeldina A o BFA (Sigma-Aldrich®, cat. B6542; MO, USA) durante 5 h.

Para los experimentos con los inhibidores farmacológicos de cinasas, las células THP-1 se incubaron previamente con cada inhibidor por 1 h; con 5 µM del inhibidor de IRAK 1/4 (Calbiochem®, cat. 407601; CA, USA) o con 0.71 µM del inhibidor de Syk (Calbiochem®, cat. 574711; CA, USA) o con 0.73 µM del inhibidor de Akt VIII (Calbiochem®, cat. 124018; CA, USA). Las concentraciones utilizadas de los inhibidores se obtuvieron al escoger la inhibición media obtenida de las curvas de dosis-respuesta a LPS de cada uno de los inhibidores mediante citometría de flujo o ELISA. Inmediatamente después de la incubación con los inhibidores, las células fueron estimuladas con los ligandos de TLRs solos o combinados con sIgG humana.

5.6. Marcaje de receptores de la superficie membranal y detección intracelular de TNF- α para citometría de flujo

Monocitos humanos se purificaron a partir de CMN de sangre periférica por selección positiva para CD14+ mediante perlas inmunomagnéticas de tecnología MACS (Miltenyi Biotec®, cat. 130-118-906; CA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Tanto para los monocitos CD14+ purificados de CMN de sangre periférica como para las células THP-1, los receptores de la superficie membranal se marcaron utilizando técnicas estándar con anticuerpos monoclonales murinos unidos a fluoróforos que detectan proteínas humanas como se indica a continuación.

Anti-hCD14-APC clona M5E2 (BD Pharmingen®, cat. 550376; NJ, USA), Anti-hTLR2-FITC clona TL2.1 (eBioscience®, cat. 14-9922-82; MA, USA), Anti-hTLR4-PE clona HTA-125 (eBioscience®, cat. 14-9917-82; MA, USA), Anti-hCD64-PE clona 10.1 (Biolegend®, cat. 305007; CA, USA), Anti-hCD32 FITC clona FUN-2 (Biolegend®, cat. 303201; CA, USA) y Anti-hCD16-FITC clona 3G8 (BD Pharmingen®, cat. 560996; NJ, USA).

Para la detección de TNF- α intracelular, se incubaron las células CMN de sangre periférica y las células THP-1 con BFA por 5 h, se permeabilizaron utilizando los reactivos Cytotfix/Cytoperm® (BD®; cat. BDB554714; CA, USA) según las indicaciones del fabricante e incubaron posteriormente durante 1 h a 4 °C con cantidades saturantes del anticuerpo monoclonal murino Anti-hTNF- α -PE clona MAb11 (BD Pharmingen®, cat. 559321; NJ, USA).

Las células se lavaron y se fijaron en paraformaldehído al 1%. Se adquirieron un total de 30,000 a 50,000 células por cada condición en un citómetro de flujo FACSCalibur® (BD®, cat. 643271; CA, USA). Los gráficos y el análisis de los datos se realizaron utilizando los programas BD CellQuest Pro® (BD®, cat. 349226; CA, USA) o FlowJo® (BD®, cat. 9.9.6 release; CA, USA).

5.7. ELISA para TNF- α

Después de estimular tanto las CMN de sangre periférica como la línea celular THP-1 por 12 h, se obtuvieron los sobrenadantes libres de células, por centrifugación y lavado, y se almacenaron a 4 °C para posteriormente evaluar la producción de TNF- α por ELISA.

El TNF- α de los sobrenadantes se cuantificó mediante un ensayo tipo sándwich de ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas) que se elaboró en el laboratorio con anticuerpos de captura y detección de un kit de ELISA para detección de TNF- α (Thermo Scientific®, cat. KAC1751; MA, USA) en placas de 96 pozos Costar® y con otros componentes que se tenían por separado.

Las placas se recubrieron durante toda una noche a 4 °C con 4 μ g/mL de anticuerpo de captura de TNF- α en PBS, se lavaron tres veces con una solución de PBS/BSA/Tween-20 y se bloquearon con SuperBlock® (Thermo Scientific®, cat. 37515; MA, USA) durante 15 min a 37 °C y se volvieron a lavar con PBS-BSA-Tween-20.

A las placas recubiertas con el anticuerpo de captura se les añadió, además de los sobrenadantes recolectados, una curva de concentración patrón de TNF- α humano recombinante (R&D Systems, cat. 210-TA; MN, USA), y las placas se incubaron por 2 h a 37 °C; después, las placas se lavaron e incubaron durante 1 h más con 300 ng/mL de anticuerpo de detección para TNF- α humano acoplado a biotina.

Después del lavado, las placas se incubaron con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich®, cat. P7998; MO, USA) y esta reacción se detuvo con una solución de NaOH 1 M.

Las placas se leyeron a 405 nm en un espectrofotómetro con lector de placas Multiskan® FC (Thermo Scientific®, cat. 51119000; MA, USA). El límite inferior de sensibilidad de la técnica es de 15 pg/mL.

5.8. Transcripción reversa y PCR en tiempo real para la valoración de la expresión genética de TNF- α

Después de la estimulación de las células THP-1, se extrajo el RNA total a los diferentes tiempos evaluados empleando el reactivo de TRIzol® (Gibco®, cat. 15596; MA, USA) y se realizó la transcripción reversa con un kit de síntesis de cDNA (Thermo Scientific®, cat. K1621; MA, USA).

El cDNA fue utilizado para realizar una PCR cuantitativa en tiempo real con la mezcla maestra qRT-PCR TaqMan® (Applied Biosystems®, cat. 4444557; CA, USA) y para el análisis de datos se usó el método comparativo $\Delta\Delta Ct$.

Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron en pozos duplicados de acuerdo con el protocolo para ensayos de expresión genética TaqMan® en un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus® (Applied Biosystems®, cat. 4376600; MA, USA).

Se evaluó el gen de TNF- α con secuencia Hs00174128_m1 con una sonda TaqMan® (Applied Biosystems®, cat. 4331182; MA, USA). Los valores de Ct para el gen TNF- α fueron normalizados con el gen rRNA 18S eucariótico con secuencia X03205.1, de los controles endógenos TaqMan® (Applied Biosystems®, cat. 4319413E; MA, USA).

5.9. Detección intranuclear de NF- κ B p65 por citometría de flujo

Para detectar la translocación nuclear de NF- κ B, se estimularon las células THP-1 con LPS o LPS + sIgG y se buscó la presencia de la subunidad p65 de NF- κ B al interior del núcleo.

Se estimularon 1×10^6 células THP-1 durante 30 min con LPS o LPS + sIgG y se centrifugaron (todas las centrifugaciones del método son con microcentrífuga a 4 °C) a 5,000 rpm durante 5 min.

Después de retirar el sobrenadante por completo, las células se congelaron rápidamente durante 10 min en un baño seco de hielo y etanol, y luego se lisaron mediante la resuspensión en 100 μ L de una solución amortiguadora hipotónica

(10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ y 1 mM de DTT recién añadido, pH = 7.9).

La integridad de los núcleos se evaluó al microscopio mediante tinción con azul de tripano Corning® (Thermo Scientific®, cat. 25-900-CI; MA, USA), y se observó si los núcleos permanecían intactos, con forma redonda y teñidos de color azul.

Los núcleos se recuperaron mediante centrifugación por 5 min a 5,000 rpm, después se eliminó cuidadosamente el sobrenadante empleando una micropipeta, los núcleos se fijaron añadiendo 100 µL de paraformaldehído helado al 4% en PBS por 30 min e inmediatamente, los núcleos se marcaron para el análisis por citometría de flujo o se mantuvieron a 4 °C para la tinción al día siguiente.

Después de la fijación anterior, los núcleos se centrifugaron por 3 min a 5000 rpm y el sobrenadante se eliminó cuidadosamente con una micropipeta; posteriormente, los núcleos se permeabilizaron resuspendiendo en 100 µL de una solución helada de Tritón X-100 al 0.1 % y paraformaldehído al 4 % en PBS.

Después de 10 min de incubación en hielo, los núcleos se centrifugaron 3 min a 5,000 rpm y el sobrenadante se eliminó cuidadosamente pipeteando lentamente. Luego, los núcleos se bloquearon resuspendiendo suavemente en 500 µL de PBS helado que contenía 4% de FBS y se incubaron durante 20 min en hielo.

Después, se centrifugaron por 3 min a 5,000 rpm y se resuspendieron en 100 µL de FBS al 4% en PBS helado que contenía 2 µg/mL del anticuerpo policlonal primario de conejo Anti-hNF-κB p65 (SC Biotechnology®, cat. sc-372; CA, USA) e incubaron en hielo por 20 min; al finalizar, los núcleos se lavaron con 500 µL de FBS al 4% en PBS helado y se mezclaron por los tubos por inversión y se centrifugaron a 4,500 rpm durante 1 min más.

Después de una cuidadosa eliminación del sobrenadante, los núcleos se resuspendieron en 100 µL de FBS al 4% en PBS helado que contenía 1 µL de anticuerpo policlonal secundario de cabra Anti-IgG de conejo conjugado con FITC (Jackson ImmunoResearch®, cat. 111-095-003; MD, USA) y se incubó con los núcleos durante 20 min en hielo.

Después de un lavado final como en el paso anterior, ahora los núcleos se resuspendieron suavemente en 400 μ L de PBS helado que contenían 1% de paraformaldehído y se analizaron mediante citometría de flujo.

5.10. Western Blot

Células THP-1 cultivadas en placas de cultivo Corning® de 10 mm de diámetro (Corning®, cat. 10556661; NY, USA) fueron sembradas a razón de 3×10^6 células/placa) se estimularon con LPS, sIgG o ambos y luego, en puntos de tiempo predeterminados, las placas con las células se colocaron en hielo durante 5 min y se centrifugaron a $400 \times g$ durante 5 min seguido de lisis celular.

Los extractos celulares se obtuvieron por lisis en una solución amortiguadora de RIPA (0.1% deoxicocolato de sodio, 1% Nonidet-P40, 0.1% SDS en PBS, pH 7.3, con inhibidores de proteasas) seguido de centrifugación a $400 \times g$ 5 min.

La concentración de proteína se determinó mediante ensayo de Bradford Quick Start® (Bio-Rad®, cat. 5000205; CA, USA) y el lisado celular total (5 μ g/carril) se mezcló con una solución amortiguadora Laemmli (Bio-Rad®, cat. 161-0737; CA, USA) y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida Tris-Gly al 10% bajo condiciones desnaturalizantes empleando 2-mercaptoetanol en SDS-PAGE.

Los geles se transfirieron a membranas de PVDF de 0.45 μ m (Millipore®, cat. IPVH00010; MA, USA) y se bloquearon TBS-Tween-20 al 0.1% con 5% de leche descremada en polvo.

Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios (todos fueron policlonales de conejo o monoclonales murinos Anti-humanos de SC Biotechnology®; CA, USA).

Anti-NF- κ B p65 1:5,000 (cat. sc-372), Anti-p-NF- κ B p65 S536 1:1,000 (cat. sc-136548) con NaF 1 mM, Anti-I κ B- α 1:2,000 (cat. sc-371), Anti- α -Tubulina 1:5,000 (cat. sc-5286), Anti-Akt1/2/3 (cat. sc-81434) y Anti-p-Akt1 S473 (cat. sc-293125)

Las membranas se bloquearon con TBS-Tween-20 al 0.1% con 5% de leche descremada en polvo durante toda la noche a temperatura ambiente. Después se lavaron con PBS-Tween-20 al 0.1% y se incubaron durante 1 h con los anticuerpos primarios.

Al final de esta incubación las membranas se lavaron una vez más con PBS-Tween-20 al 0.1% y finalmente se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo 1:15,000 (cat. sc-2004) o anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón 1:10,000 (cat. sc-2005) ambos de SC Biotechnology®; CA, USA, esta incubación se realizó en una solución amortiguadora de TBS-Tween-20 al 0.1% con 5% de leche descremada en polvo.

El revelado de los Western Blots se realizó exponiendo una película de rayos X (Kodak®, cat. 7200; NY, USA) a las membranas tratadas con el reactivo quimioluminiscente SuperSignal® West Pico PLUS (Thermo Scientific®, cat. 34579; MA, USA).

5.11. Transfección de siRNAs de receptores FcγRs

La técnica se realizó en dos días y se siguió el protocolo de transfección de siRNAs y todos los reactivos necesarios eran de SC Biotechnology®; CA, USA.

En el día 1 se sembraron células THP-1 a razón de 0.5×10^6 células/mL en medio RMPI con 10% FSB sin antibiótico (muy importante), en una botella de cultivo de 25 cm² y se cultivaron en incubadora estándar de 12 a 18 h.

En el día 2, se preparó la solución de transfección que se obtuvo al mezclar la solución A (por cada transfección, 8 μL de siRNA en 100 μL de medio de transfección sc-36868) y la solución B (por cada transfección, 8 μL de reactivo de transfección de siRNAs sc-29528 en 100 μL de medio de transfección sc-36868). Se mezclaron ambas soluciones y se incubaron por 45 min a temperatura ambiente.

Los siRNAs que se ocuparon eran de SC Biotechnology®; CA, USA y fueron los siguientes:

siRNA irrelevante para control (cat. sc-37007), siRNA CD16 (cat. sc-42758), siRNA CD32a (cat. sc-29992), siRNA CD32b (cat. sc-42774) y siRNA CD64 (cat. sc-35017).

Durante los 45 min de incubación de la solución de transfección, se preparó una dilución 1:1 de células THP-1 con RPMI sin antibiótico y sin FSB, y se centrifugaron a 1800 rpm por 5 min. Se removió el sobrenadante y resuspendió en medio RPMI sin antibiótico y sin SFB a razón de 2 mL por cada 1×10^6 células.

Se centrifugaron los tubos nuevamente a 1800 rpm por 5 min y se les removió el sobrenadante y se resuspendieron 1×10^6 células en 800 μL de medio de transfección de siRNAs (cat. sc-36868) y se sembraron en cajas de 12 pozos con 800 μL en cada pozo para cada condición de transfección.

Terminado lo anterior, se agregó la solución de transfección que previamente se incubó por 45 min, a razón de 200 μL por cada pozo de transfección, que al sumar resulta en 1 mL de medio de transfección con 1×10^6 células por cada pozo. Se incubaron las células por 6 h en incubadora en condiciones estándar.

Se agregó 3 mL de medio RPMI con solo 1% de FSB con antibiótico en cada pozo (se puso menos FSB, para desacelerar el ciclo celular).

Finalmente, se incubaron al menos 48 h, el tiempo dependió de a qué hora el siRNA de interés ejerció su mayor efecto.

5.12. Análisis estadístico

La cuantificación por ELISA del TNF- α de los sobrenadantes de los cultivos celulares, el mRNA de TNF- α y los valores de las diferentes densitometrías de los Western Blots fueron analizados con una prueba t de Student no apareada (tipo 2, de dos colas) utilizando el programa Prism® 9.0.2 (GraphPad® Software; CA, USA), y se consideró que los valores eran significativos cuando $p < 0.05$.

6. Resultados

6.1. Determinación del estado conformacional de la IgG que se usó para los estímulos

El objetivo principal de este trabajo fue describir el efecto biológico que tiene la IgG cuando no se encuentra formando complejos inmunes; entonces se determinó el estado conformacional de la IgG que se usó para los experimentos mediante FPLC (cromatografía líquida rápida para proteínas) en una columna SEC (cromatografía de exclusión por tamaño), figura 1.

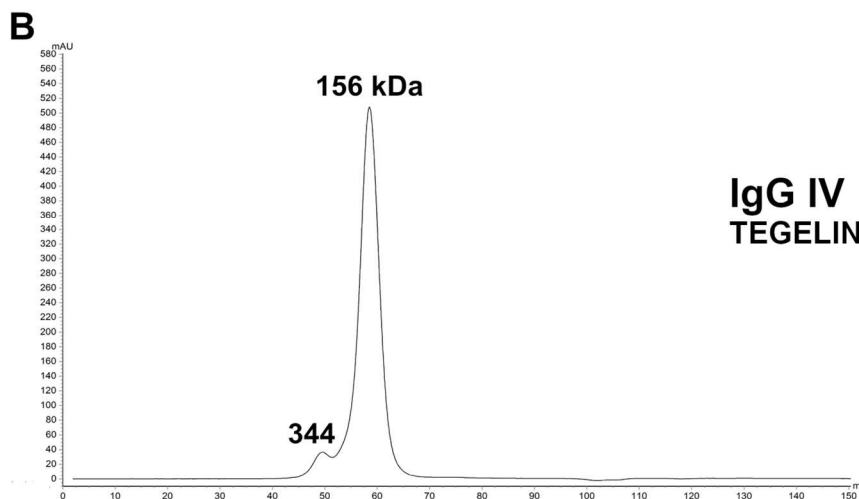
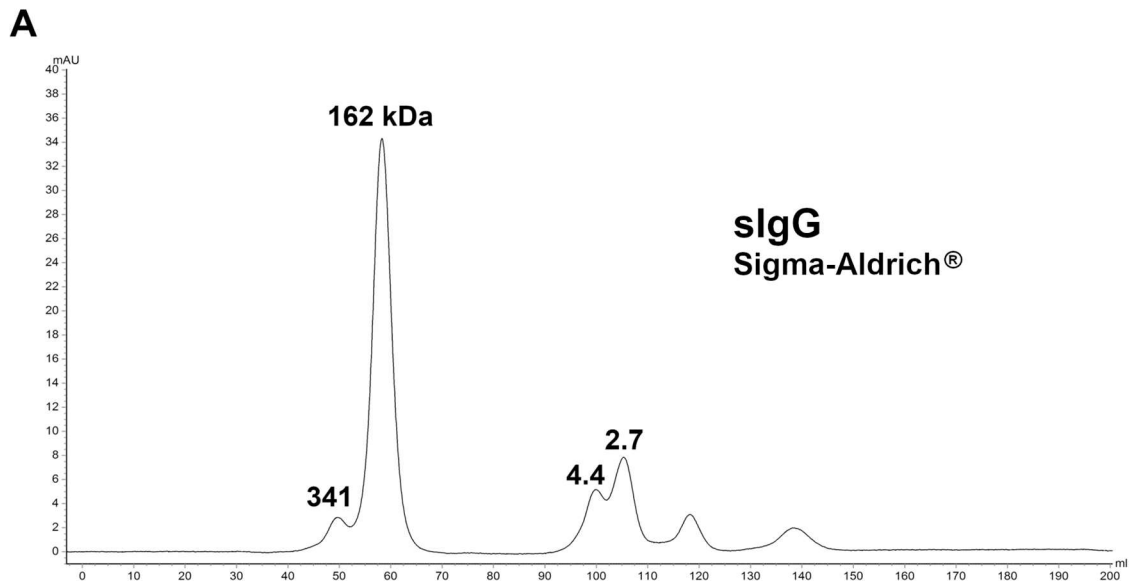


Figura 1. Análisis cromatográfico de IgG. (A) Preparación de sIgG humana, (Sigma-Aldrich® I4506) que se analizó mediante SEC en un equipo para FPLC automatizado y se eluyó con PBS, más información en el texto. (B) Preparación de IgG polivalente para uso en humanos soluble y certificada (IgG IV, TEGELINE®, LFB, Francia) que fue analizada con la misma técnica y sistema que la Figura 1A, salvo que se eluyó con RPMI, los números en los picos indican el peso molecular en kDa.

Para ambas muestras mostradas en la figura 1, se utilizó la columna Superdex 200 pg 16/600 de 100 mL que tenía un intervalo de resolución molecular de 10 a 600 kDa; la concentración de las muestras fue de 1 mg/mL y se cargó 1 mL con un flujo de 0.5 mL/min, más detalles se pueden consultar en el apartado correspondiente de materiales y métodos. Estos experimentos fueron enviados para su realización en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM.

En la figura 1A se muestra el cromatograma de la preparación de sIgG de Sigma-Aldrich®, que es la que se utilizó como estímulo en todos los experimentos de este trabajo. El cromatograma muestra que la primera fracción eluyó a los 50 mL y tiene un peso molecular de 341 kDa; esta fracción corresponde al 5% del contenido proteico total y su peso molecular correspondería al estado dimérico de IgG. A los 58 mL se observó la segunda fracción, que era el pico más prominente, de un peso molecular de 162 kDa, que es el peso molecular que se esperaría para IgG monomérica; este correspondió al 62% del contenido proteico de la muestra. Finalmente, se eluyeron 4 fracciones más en 100, 105, 118 y 139 mL que no determinamos que eran, pero podrían corresponder a péptidos de con pesos moleculares menores a 5 kDa; es probable que estos fragmentos fueran producidos por la lisis de IgG y correspondían al 33% restante del contenido proteico. Estos resultados contrastan con la descripción del fabricante que reporta un mínimo de 95% de IgG en sus liofilizados y nuestro cromatograma mostró que la suma de la IgG monomérica (62%) y la IgG dimérica (5%) sólo llega al 67% del contenido proteico total.

Los experimentos mostrados en la figura 1B se realizaron en las mismas condiciones que los de la figura 1A, salvo que la elución fue con RPMI en vez de PBS; la muestra ocupada fue una preparación de IgG polivalente soluble de uso en humanos y que tiene certificación del fabricante de ser monomérica. El cromatograma muestra que a los 50 mL eluye la primera fracción de un peso molecular de 344 kDa que corresponde al 6% de la proteína total. A los 58 mL

eluyó la fracción principal de 156 kDa, correspondiente al 94% de la proteína total. Los pesos moleculares de estos dos picos son consistentes con el de los dímeros (344 kDa) y los monómeros (156 kDa) de IgG respectivamente, que reporta el fabricante en su certificado de análisis.

Solo la IgG IV TEGELINE® (figura 1B) tenía una certificación del fabricante de que era IgG monomérica, nosotros la usamos como estándar primario y por su elevado precio, decidimos utilizar la sIgG humana de Sigma-Aldrich® para los estímulos (figura 1A); se observó que sus perfiles cromatográficos eran similares y, según sus respectivos fabricantes, ambas eran IgG polivalente, lo cual no se comprobó directamente, sino que solo se verificó su estado conformacional como dímeros o monómeros de IgG.

6.2. Caracterización de receptores TLRs y FcγRs en los monocitos de CMN de sangre periférica

Caracterizamos el inmunofenotipo molecular de monocitos provenientes de CMN de sangre periférica usando citometría de flujo. El objetivo fue determinar la presencia en la superficie celular de los receptores asociados a los ligandos o estímulos que se ocuparon en este trabajo, figura 2.

Uno de los intereses del laboratorio era comparar el efecto entre dos receptores relacionados que inducen la producción de TNF- α , por lo que además de evaluar para CD14 y TLR4 (correceptores de LPS), también inmunotipificamos para TLR2 (receptor de P3C y LPG), además de a los FcγRs (receptores de IgG).

Se obtuvieron CMN de sangre periférica a partir de unidades de paquetes leucocitarios de donantes del banco de sangre del INCMNSZ utilizando un gradiente de Lymphoprep®; posteriormente, se aislaron monocitos mediante inmunoseparación magnética utilizando anticuerpo anti-CD14 como se describe en materiales y métodos.

Los resultados de un experimento representativo de la tinción de superficie de los receptores previamente mencionados en los monocitos obtenidos de CMN de sangre periférica se puede observar en la figura 2, la viabilidad de las células se verificó en microscopio mediante tinción con azul de tripano.

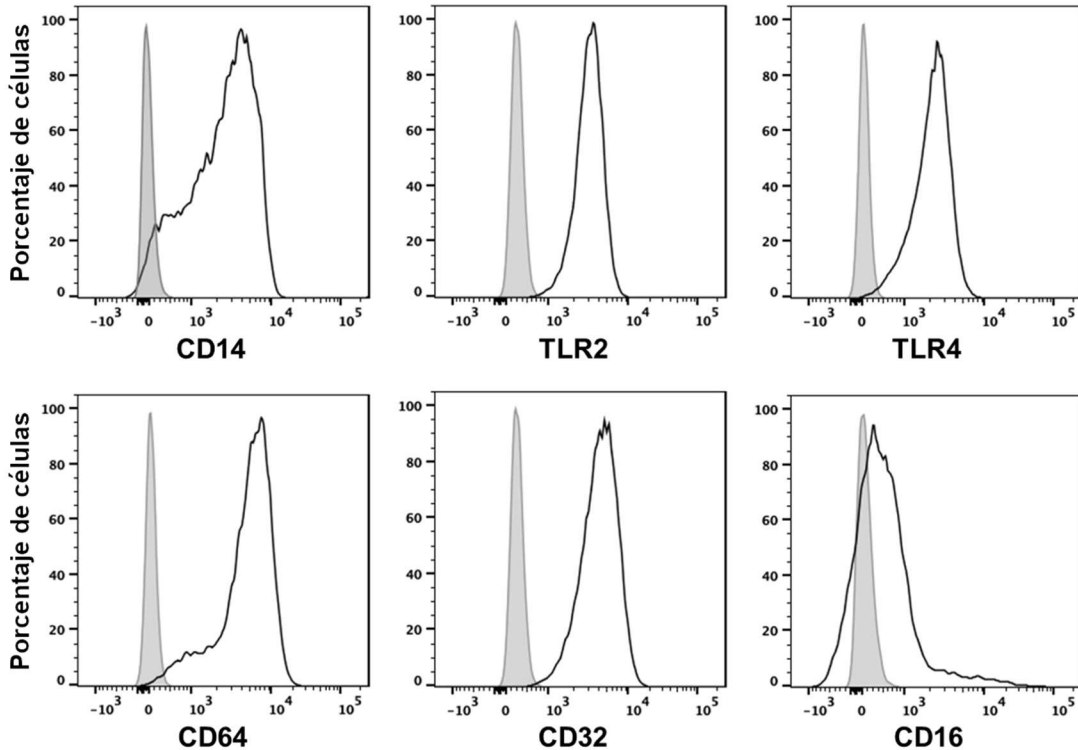


Figura 2. Inmunofenotipo de células mononucleares (CMN) de sangre periférica. *Tinción de superficie de diferentes receptores de monocitos CD14+ humanos purificados por inmunoseparación magnética (ver apartado de materiales y métodos) a partir de CMN de sangre periférica de donantes del banco de sangre del INCMNSZ. Los histogramas de color gris corresponden al control negativo sin tinción.*

En la figura 2, la fluorescencia está representada en el eje de las abscisas, y en el eje de las ordenadas se grafica el porcentaje de células positivas, que está normalizado al 100% con respecto al control sin tinción y representado por los histogramas de color gris.

En el primer histograma de la figura 2 que corresponde al receptor CD14, se observa que toda la población celular es positiva a CD14, en mayor o menor grado. La asimetría del histograma representa diferentes subpoblaciones celulares en la muestra. La positividad a CD14 es esperada ya que estas células se obtuvieron a partir de inmunoseparación magnética con anticuerpo Anti-CD14. Células obtenidas de CMN de sangre periférica que son CD14+ se consideran monocitos.

Siguiendo con el segundo histograma de la figura 2, detectamos al receptor TLR2, lo hicimos porque más adelante usaríamos sus ligandos P3C o LPG como estímulos en nuestras condiciones experimentales. Observamos un pico simétrico, lo que interpretamos como una población homogénea de monocitos TLR2+.

En el tercer histograma de la parte superior de la figura 2 podemos observar la determinación de la expresión del receptor TLR4. Si bien el pico mostró simetría, éste presentó una base más amplia del lado izquierdo, sugiriendo una pequeña población de monocitos con baja expresión de TLR4. Aun así, consideramos que se mostraba una población mayoritariamente homogénea de monocitos TLR4+.

En el primer histograma de la parte inferior de la figura 2 se muestran los resultados obtenidos para CD64, único receptor de Fc de IgG que está reportado que tiene la capacidad de unir a IgG monomérica. Detectamos 2 poblaciones ligeramente traslapadas. El pico más pequeño representa a los monocitos que tienen baja expresión de CD64; y el más grande y predominante los que tienen proporcionalmente mayor cantidad de CD64 en su superficie; aunque se sabe que los monocitos producen constitutivamente CD64 en una relación directamente proporcional con la producción de CD14.

El segundo histograma de la parte inferior de la figura 2 corresponde a la detección del receptor de Fc de IgG CD32. De este receptor existen 3 subtipos: CD32a, CD32b y CD32c, aunque el anticuerpo Anti-CD32 utilizado en la técnica de tinción no distingue entre ellos. Los niveles combinados del receptor CD32 fueron similares en toda la población de monocitos, siendo un pequeño desplazamiento a la izquierda levemente observado.

Finalmente, los niveles en superficie del receptor CD16 se observan en el histograma inferior de la derecha de la figura 2. Se sabe que existen dos subpoblaciones de monocitos que se diferencian entre ellas por sus niveles bajos o altos de CD16. Observamos monocitos CD16- que tienen valores que se traslapan con los valores del control sin tinción, otra población heterogénea de monocitos con una producción intermedia del receptor CD16 y una tercera población minoritaria desplazada hacia la derecha de monocitos CD16+.

Aunque la técnica de tinción de superficie de los receptores es semicuantitativa y es consistente con las publicaciones al respecto del inmunofenotipo que se espera de los monocitos; lo que consideramos como un resultado positivo.

6.3. Solo los monocitos de CMN de sangre periférica respondieron a los estímulos y no los linfocitos

El inmunofenotipo de células CD14+ (monocitos) de CMN de sangre periférica que se mostró en la figura 2 se realizó mediante purificación por inmunoseparación magnética utilizando anticuerpo primario anti-CD14; el cual se ha reportado en la literatura y en nuestro laboratorio también que inhibe la actividad del correceptor CD14 (necesaria para la señalización en respuesta a LPS). Por lo cual, realizamos experimentos en un ambiente libre de anticuerpo anti-CD14 ya que no disponíamos del sistema para purificación negativa.

Como se ocupó la población completa de CMN de sangre periférica, la cual tiene dos subpoblaciones predominantes, la de monocitos y la de linfocitos, era importante realizar un control que mostrara que solo los monocitos responden al LPS, y no así los linfocitos.

En las CMN de sangre periférica, los monocitos son una minoría, siendo éstos en condiciones normales 8-16% de las células presentes en los CMN de sangre periférica. Las subpoblaciones mencionadas se pueden observar en la figura 3.

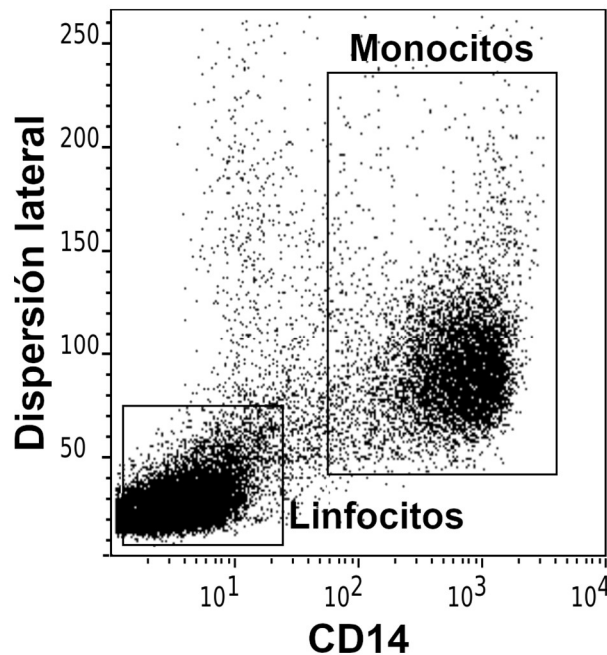


Figura 3. Linfocitos y monocitos en CMN de sangre periférica. Tinción de superficie con anticuerpo Anti-CD14 de CMN de sangre periférica, los monocitos se diferencian de los linfocitos ya que son CD14+ y tienen una mayor dispersión lateral.

La respuesta al LPS se midió como la acumulación intracelular de TNF- α , que además se utilizó como un marcador de la actividad proinflamatoria de los monocitos; en la figura 4 puede observarse un experimento representativo.

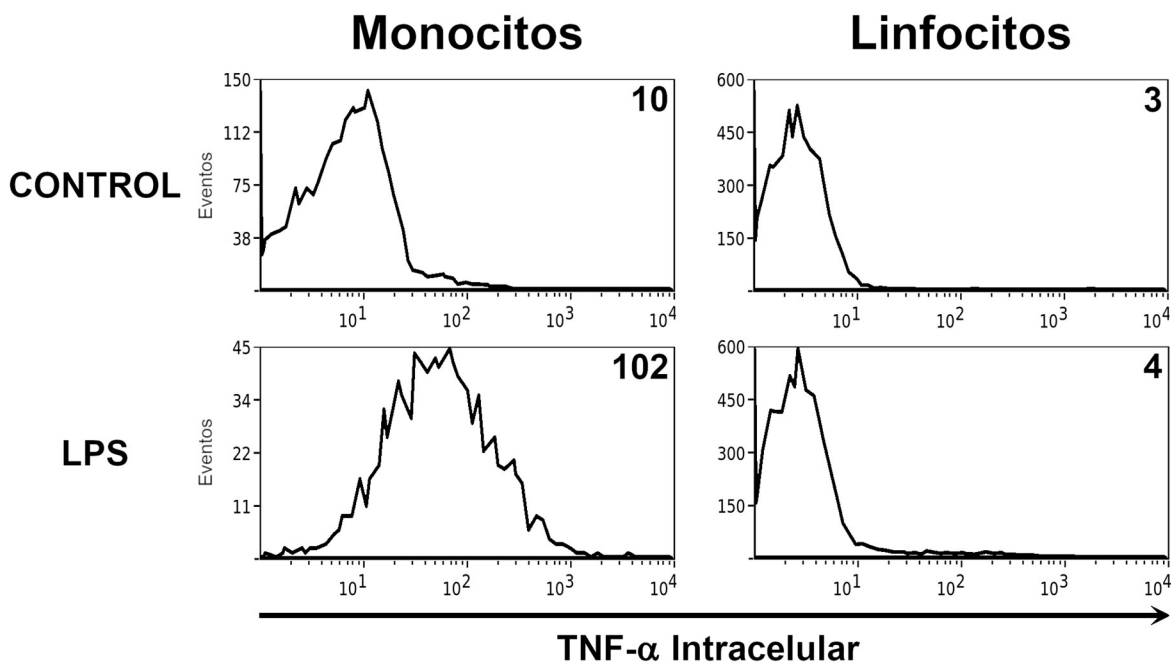


Figura 4. Respuesta a LPS de monocitos y linfocitos en CMN de sangre periférica. Histogramas que muestran la acumulación intracelular de TNF- α (el número en la esquina superior derecha es la intensidad media de fluorescencia, MFI) medida en subpoblaciones de monocitos o linfocitos de una muestra de CMN de sangre periférica en condiciones sin estimular (CONTROL) o 5 h después de exposición a LPS 10 ng/mL en presencia de BFA, un experimento representativo de un total de tres.

En las figuras 3 y 4 se trata de las mismas células, en la figura 4 se escogieron las regiones de linfocitos y monocitos definidas por la dispersión lateral y por la positividad para la tinción de superficie de CD14, mostradas en la figura 3.

Como se observa en la figura 4, la estimulación con LPS de CMN de sangre periférica aumenta la acumulación de TNF- α intracelular en la subpoblación celular definida como monocitos y no así en la subpoblación de linfocitos, que es lo que se quería mostrar.

6.4. Curva dosis-respuesta de monocitos de CMN de sangre periférica que fueron co-estimulados con LPS + sIgG

Se determinó la concentración de sIgG que se utilizó en los experimentos, se sabía previamente en el laboratorio que los monocitos de las CMN de sangre periférica se podían activar con LPS 10 ng/mL y la respuesta a esta activación se midió como la producción de TNF- α mediante la técnica de ELISA, figura 5.

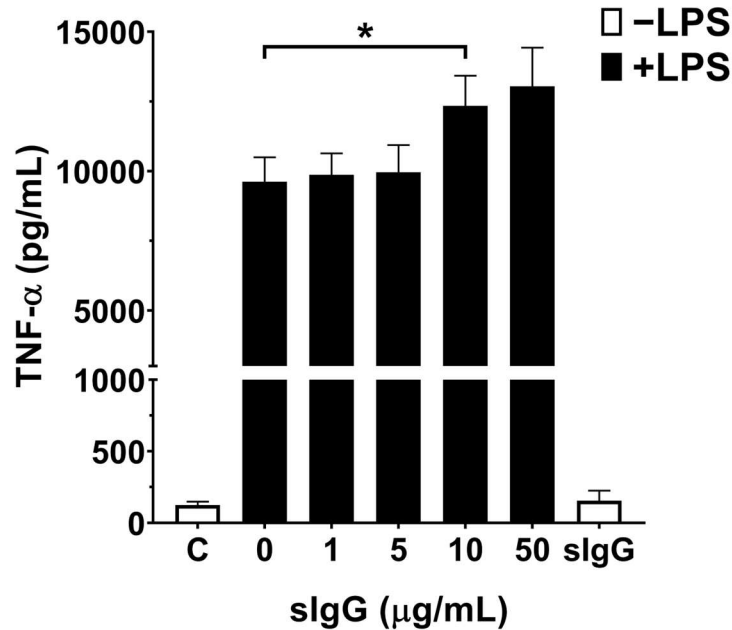


Figura 5. Curva dosis-respuesta para sIgG en monocitos. CMN de 5 donadores del banco de sangre del INCMNSZ se estimularon con 10 ng/mL de LPS (barras negras) y las cantidades indicadas de sIgG; las barras blancas indican que no hubo estimulación (C=control) o se estimuló solo con sIgG 50 $\mu\text{g/mL}$; se evaluó el TNF- α en sobrenadantes a las 12 h mediante ELISA; $p < 0.05$.

En la figura 5 se dividió el eje de las ordenadas en dos segmentos para que se observe con claridad que los monocitos producen una cantidad mínima de 156 pg/mL de TNF- α cuando son estimulados únicamente con sIgG 50 $\mu\text{g/mL}$ (última columna), y que esto no es significativamente diferente a los 124 pg/mL de TNF- α producidos por los monocitos no estimulados (C=control, en la figura 5).

La atención en la figura 5 debe centrarse ahora en las barras negras, donde simultáneamente se estimula a los monocitos con LPS 10 ng/mL (se mantiene

constante) junto con diferentes concentraciones de sIgG $\mu\text{g/mL}$; se observó una tendencia creciente hasta alcanzar una saturación (donde ya no era estadísticamente significativa la diferencia) en la condición de sIgG 50 $\mu\text{g/mL}$; por otro lado, las condiciones de sIgG 0 y 10 $\mu\text{g/mL}$ muestran una diferencia estadísticamente significativa con $p < 0.05$ en la producción de TNF- α . Con estos datos, decidimos entonces ocupar la concentración de sIgG 10 $\mu\text{g/mL}$ para los experimentos siguientes.

6.5. Monocitos de CMN de sangre periférica no aumentaron la producción de TNF- α cuando se co-estimularon con el ligando P3C de TLR2 + sIgG

Quisimos determinar la especificidad de la respuesta a sIgG, si era un efecto relacionado con LPS ligando de TLR4, u otros ligandos inductores de la producción de TNF- α combinados con sIgG también tenían un efecto potenciador, por lo que probamos con el ligando sintético de TLR2: Pam3CSK4, denominado P3C en la figura 6B y donde se observaron los niveles de TNF- α producidos por los monocitos de CMN de sangre periférica estimulados con diferentes ligandos.

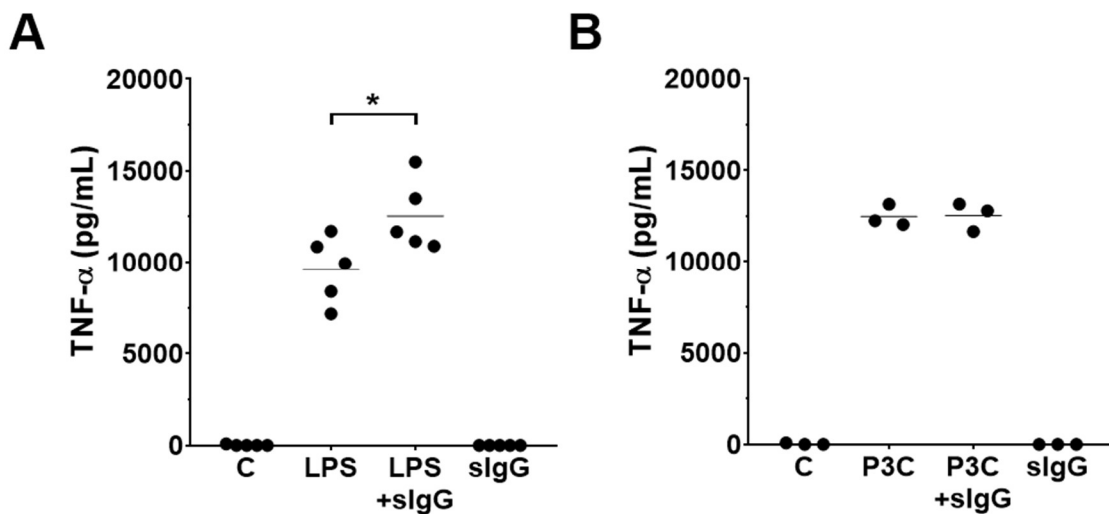


Figura 6. Producción de TNF- α de monocitos en respuesta a LPS + sIgG y P3C + sIgG. (A) CMN de sangre periférica de 5 donantes del banco de sangre del INCMNSZ se estimularon *in vitro* con 10 ng/mL de LPS (ligando de TLR4), 10 $\mu\text{g/mL}$ de sIgG, o ambos, y se evaluó la producción de TNF- α en sobrenadantes a las 12 h mediante ELISA. (B) Mismas condiciones experimentales del inciso A para tres donantes, pero usando P3C (ligando de TLR2) a 1 $\mu\text{g/mL}$ en vez de LPS. C=Control sin estímulo, * $p < 0.05$.

En la figura 6 se detectó la presencia de TNF- α mediante cuantificación por ELISA en los sobrenadantes de monocitos de CMN de sangre periférica a las 12 horas posteriores a la estimulación. Los monocitos que no se estimularon (C=Control) o que fueron estimulados únicamente con sIgG, no produjeron cantidades detectables de TNF- α .

En la figura 6A, el rango de producción de TNF- α de los monocitos de CMN de sangre periférica de los distintos donantes es heterogénea e iba desde 7,168 pg/mL hasta 11,718 pg/mL cuando estos han sido estimulados con LPS, que corresponde a una variación hasta del 63% en la producción de TNF- α ; aun así, pudimos encontrar una diferencia estadísticamente significativa de un 30% de aumento en la producción de TNF- α al co-estimular con LPS + sIgG comparado con estimular solo con LPS (la prueba estadística se hizo con los porcentajes de variación, en vez de las concentraciones de TNF- α); aunque el efecto observado deja de ser estadísticamente significativo cuando calculamos el promedio de producción de TNF- α en concentración de pg/mL, debido a la variación intrínseca en la respuesta al LPS en los monocitos de diferentes donantes.

En la figura 6B se usaron monocitos de CMN de sangre periférica de tres donantes, los cuales se estimularon con el ligando sintético P3C del receptor TLR2. Los resultados fueron distintos a los de la figura 6A donde se usó LPS, ya que si se estimuló con P3C o co-estimuló con P3C + sIgG no hubo diferencias estadísticamente significativas en la producción de TNF- α entre ambas condiciones, la producción promedio de TNF- α fue de 12,500 pg/mL sin importar si se usó la sIgG en los estímulos o no.

El TNF- α autoinduce su producción en los monocitos de CMN de sangre periférica, por lo que decidimos también medir la acumulación intracelular de TNF- α (en vez de solo cuantificar en sobrenadantes) agregando Brefeldina A (BFA, que inhibe el tráfico vesicular) desde una hora previa y hasta que finalizó la estimulación de 5 h de los monocitos de CMN de sangre periférica.

En la figura 7, se observa un experimento representativo de un total de tres, donde se graficaron los niveles de acumulación intracelular de TNF- α en respuesta a los estímulos indicados en monocitos de CMN de sangre periférica que habían sido marcados simultáneamente con anticuerpo anti-CD14-APC y anti-TNF- α -PE. El número dentro de los histogramas en la esquina superior derecha es la intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés).

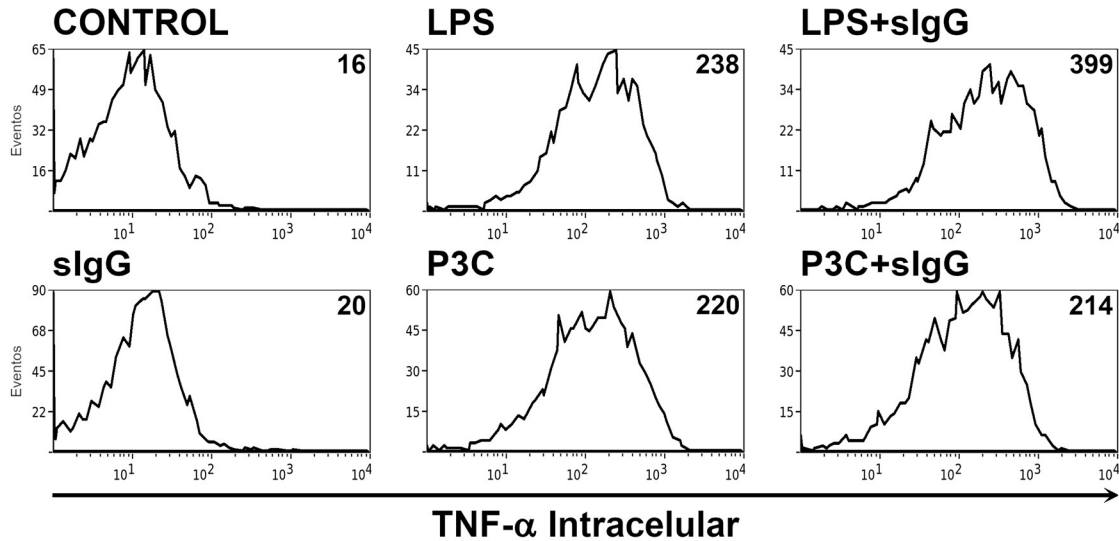


Figura 7. Acumulación intracelular de TNF- α en monocitos como respuesta a la co-estimulación con LPS + sIgG o P3C + sIgG. Monocitos de CMN de sangre periférica, de un donante del banco de sangre del INCMNSZ, se estimularon in vitro como se indica en cada columna en presencia de BFA durante 5 h. Se grafican las células que fueron CD14+ usando un anticuerpo anti-CD14-APC y se usó simultáneamente el anticuerpo anti-TNF- α -PE para detectar la presencia intracelular de TNF- α , mediante citometría de flujo. Se muestra un experimento representativo de un total de tres, el número en la esquina superior derecha es la intensidad media de fluorescencia (MFI). Control = sin estímulo, LPS 10 ng/mL, P3C 1 μ g/mL y sIgG 10 μ g/mL.

Pudimos observar que en las condiciones control sin estímulo o la estimulación con sIgG, la acumulación intracelular de TNF- α es muy similar, con valores de MFI de 16 y 20 respectivamente, figura 7. Estos resultados fueron consistentes con lo observado previamente por la técnica de ELISA en la figura 6, que mostró que sIgG no indujo una producción de TNF- α significativamente diferente al control sin estimular.

En la figura 7 se compara también la acumulación de TNF- α cuando los monocitos se estimularon con LPS y cuando se co-estimularon con LPS + sIgG; donde se observó un aumento de 161 MFI y quedó evidenciado también que no toda la población de monocitos respondió.

Ahora bien, en los paneles inferiores de la figura 7, los monocitos se estimularon con P3C, un ligando sintético del receptor TLR2, y se co-estimularon con P3C + sIgG en el siguiente panel. Lo que se observó es que no hubo diferencias

significativas (cuando se analizan los tres experimentos realizados, datos no mostrados) entre estimular con P3C y co-estimular con P3C + sIgG, incluso la MFI es ligeramente menor, pasando de 220 a 214.

6.6. Cambio de modelo de estudio: de monocitos de CMN de sangre periférica a la línea celular monocítica THP-1

Decidimos cambiar de modelo de estudio por las siguientes razones:

- 1) Variaciones intrínsecas de hasta el 63% en la producción de TNF- α como respuesta al LPS en los monocitos de CMN de sangre periférica de los diferentes donantes.
- 2) No teníamos manera de purificar los monocitos para evitar trabajar con poblaciones celulares mezcladas con linfocitos y otras células provenientes de las CMN de sangre periférica.
- 3) La activación previa de los monocitos de CMN de sangre periférica de los diferentes donantes; es decir, muestras de monocitos ya producían TNF- α sin que hubieran sido estimuladas previamente en el laboratorio.
- 4) Limitaciones de horario y cantidad de muestras obtenidas del banco de sangre del INCMNSZ.
- 5) Las técnicas de transfección de siRNAs no habían sido probadas antes en nuestro laboratorio, quisimos estandarizar primero en una línea celular.

Elegimos entonces continuar este trabajo con la línea celular humana THP-1, de origen monocítico, e hicimos los mismos experimentos que ya habíamos hecho antes con los monocitos de CMN de sangre periférica.

6.7. Caracterización de los receptores TLRs y Fc γ Rs en la línea celular THP-1

Se realizó el mismo inmunofenotipo a la línea celular THP-1 que lo que se hizo para los monocitos de CMN de sangre periférica que se mostraron en la figura 2, los receptores de superficie de nuestro interés eran los correceptores para LPS: CD14 y TLR4, el receptor TLR2 y los receptores Fc γ Rs: CD64, CD32 y CD16, se pueden observar los resultados de la citometría de flujo correspondiente en la figura 8 a continuación.

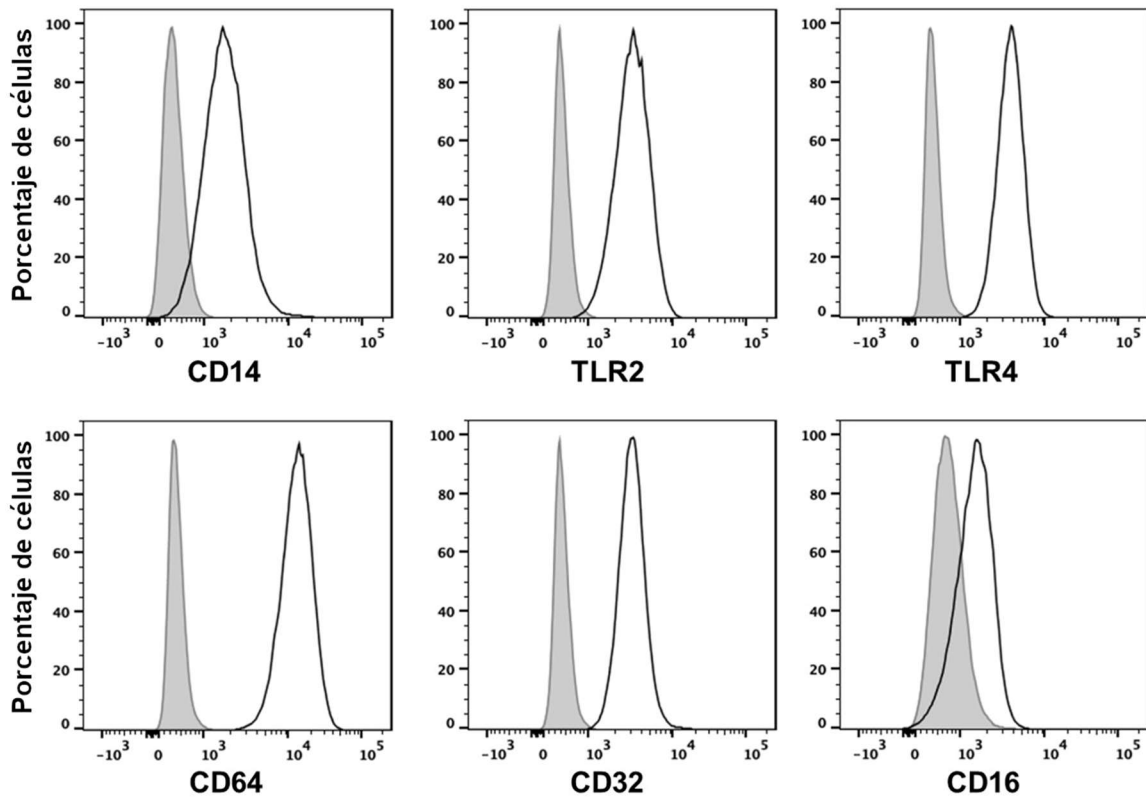


Figura 8. Inmunofenotipo de monocitos de la línea celular THP-1. *Tinción de superficie de los receptores indicados en la línea celular THP-1. Los histogramas de color gris corresponden al control negativo sin tinción.*

Se observa en la figura 8 que se encontraban presentes los dos receptores que reconocen a LPS, el receptor CD14 y el receptor TLR4. La población de células THP-1 es homogénea para ambos receptores, y CD14 además es un marcador molecular de monocitos.

El receptor TLR2 es de la misma familia que TLR4 y era necesario verificar su presencia ya que posteriormente usaríamos ligandos de TLR2 para comparar con los efectos observados al utilizar el ligando LPS de TLR4. Encontramos que TLR2 se expresa de manera homogénea en las células THP-1 como se observa en el histograma superior central de la figura 8.

En la figura 8 también se mide la expresión de los receptores de Fc de IgG, los FcγRs. Observamos la presencia de CD64, CD32 y CD16, todos ellos se expresan

de manera homogénea también en las células THP-1 cuando se comparan con los monocitos de CMN de sangre periférica mostrados en la figura 2.

Debido a que la línea celular THP-1 tiene como origen una leucemia monocítica aguda, sabíamos que era inestable genéticamente, y por esta razón los experimentos mostrados en la figura 8 se realizaron con una regularidad semanal para verificar que las células THP-1 todavía expresaban en su superficie todos los receptores mencionados. Alrededor del pasaje 20 en cultivo, que correspondía aproximadamente a un mes y medio, es donde se observó que las células THP-1 disminuían la expresión de los receptores de interés, por lo que se procedía a descongelar otro vial de células THP-1 de los primeros 3 pasajes.

6.8. Curva dosis-respuesta de TNF- α para los estímulos LPS, LPS + sIgG o sIgG en células THP-1

Determinamos los niveles de producción de TNF- α en las células THP-1 al estimularlas con cantidades variables de LPS o sIgG. Cuantificamos la producción de TNF- α mediante la técnica de ELISA en los sobrenadantes donde de las células THP-1 a las 12 h posteriores a la estimulación, figura 9.

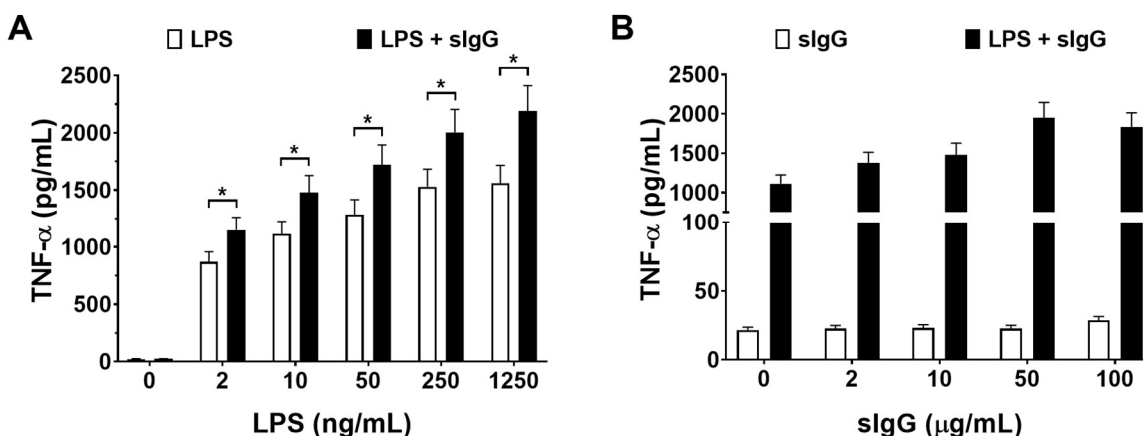


Figura 9. Curvas de dosis-respuesta para la producción de TNF- α por células THP-1 en sobrenadantes a las 12 h. (A) Células THP-1 se estimularon con dosis crecientes de LPS (barras blancas) o co-estimulando con 10 μ g/mL de sIgG (barras negras), después se evaluó la producción TNF- α mediante ELISA. (B) Células THP-1 fueron estimuladas con dosis crecientes de sIgG (barras blancas) o co-estimulando con 10 ng/mL de LPS (barras negras), y se evaluó la producción de TNF- α mediante ELISA. n=5, * p < 0.05.

En la figura 9A se observa la producción de TNF- α de células THP-1 estimuladas con concentraciones crecientes de LPS (barras blancas), desde 2 ng/mL hasta 1250 ng/mL y la condición control era sin estimular; en las barras negras los experimentos consistían en co-estimular con una cantidad constante de sIgG 10 μ g/mL, y el control era agregar únicamente sIgG.

Pudimos observar (barras blancas de la figura 9A) que las células THP-1 responden a LPS de manera proporcional a la dosis utilizada, a mayor cantidad de LPS utilizado mayor era la producción de TNF- α ; y los niveles de producción de TNF- α ya no eran estadísticamente diferentes a concentraciones mayores a 250 ng/mL de LPS. En cambio, en las barras negras se muestra la producción de TNF- α en respuesta a la co-estimulación con LPS + sIgG, variando las concentraciones de LPS y manteniendo constante a 10 μ g/mL la concentración de sIgG, donde pudimos observar que a partir de 250 ng/mL de LPS + sIgG, la producción de TNF- α ya no era estadísticamente diferente; también observamos que para cualquier concentración de LPS que se ocupó, al co-estimular con sIgG se tuvo un aumento estadísticamente significativo en la producción de TNF- α .

En ambos casos de la figura 9A, los controles sin estimular y los que fueron estimulados solo con sIgG se inducía una mínima producción de TNF- α , ya en los límites inferiores de la detección de la técnica de ELISA.

En la figura 9B hicimos experimentos donde mantuvimos constante la concentración de LPS a 10 ng/mL y fuimos variando las concentraciones de sIgG para la co-estimulación con LPS + sIgG; mostramos un corte en el eje de las ordenadas de la gráfica para hacer notoria la diferencia entre la producción de TNF- α al estimular solo con sIgG (barras blancas) y al co-estimular con LPS + sIgG (barras negras); al estimular solo con sIgG se produjeron cantidades de TNF- α que iban de 20 a 30 pg/mL independientemente de la concentración de sIgG utilizada; la producción de TNF- α no fue estadísticamente diferente al control sin estimular en estos experimentos.

Ahora bien, también vemos en la figura 9B que al co-estimular con LPS 10 ng/mL y concentraciones variables de sIgG (barras negras), la producción de TNF- α aumenta desde la primera concentración de 2 μ g/mL sIgG ocupada y usando concentraciones más altas de sIgG ya no era estadísticamente diferente la producción de TNF- α , aunque se observó una pequeña tendencia al alza.

Al final escogimos la concentración de 10 ng/mL de LPS y 10 µg/mL de sIgG para los estímulos de los experimentos restantes, porque a esas concentraciones era donde más diferencia hubo en la producción de TNF-α entre la estimulación con LPS y la co-estimulación con LPS + sIgG.

Repetimos 4 veces más los experimentos de estimulación con LPS y co-estimulación con LPS + sIgG, pasando de una n = 5 de la curva dosis-respuesta de la figura 9, a una n = 9 en la figura 10; en la cual se observó que al co-estimular con LPS + sIgG hubo un aumento del 33% respecto a la estimulación solo con LPS, pasando de 1113 ng/mL a 1480 pg/mL de TNF-α respectivamente.

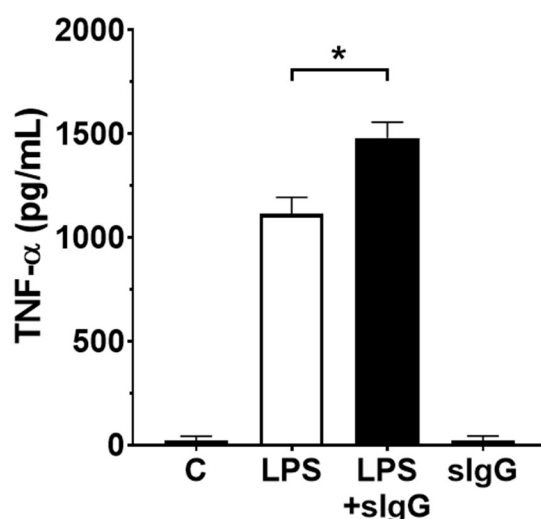


Figura 10. Aumento en la producción de TNF-α por células THP-1. Células THP-1 se estimularon con 10 ng/mL de LPS (barra blanca) y co-estimulando con 10 µg/mL de sIgG (barra negra), después se evaluó la producción TNF-α mediante ELISA a las 12 h. C=Control sin estimular, n= 9, * p < 0.05.

Por otro lado, debido a que TNF-α autoinduce su producción, realizamos experimentos de acumulación intracelular de TNF-α utilizando BFA para inhibir el tráfico vesicular en las células, de la misma manera que ya lo habíamos hecho con monocitos de CMN de sangre periférica mostrada en las figuras 4 y 7; un experimento representativo de tres en total se muestra en la figura 11 a continuación.

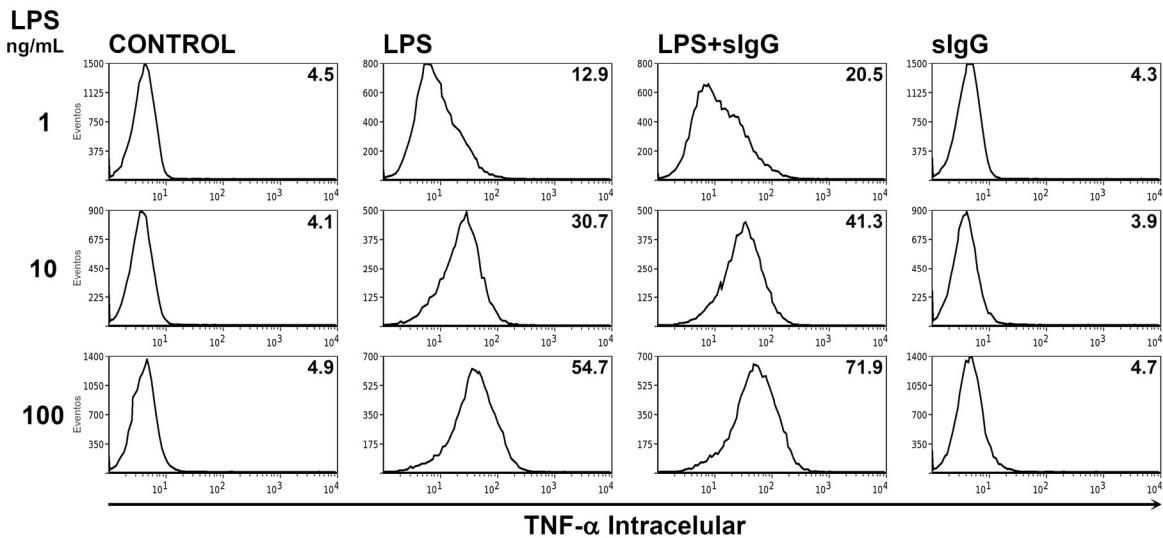


Figura 11. Curva dosis-respuesta para células THP-1 por acumulación intracelular de TNF- α . Células THP-1 se estimularon con dosis crecientes de LPS, agregando simultáneamente 10 μ g/mL de sIgG o únicamente 10 μ g/mL de sIgG en presencia de BFA. Se evaluó la acumulación intracelular de TNF- α mediante citometría de flujo a 5 h posteriores a la estimulación. Los números en los histogramas representan la intensidad media de fluorescencia. CONTROL= sin estimular.

En la figura 11 la concentración de 10 μ g/mL de sIgG permaneció constante en todos los experimentos y sólo variamos las concentraciones de LPS (1, 10 y 100 ng/mL); en la figura 11 tuvimos varias lecturas de los resultados a la vez, la primera lectura era que en las condiciones CONTROL sin estimular o estimuladas únicamente con sIgG, la producción de TNF- α no era estadísticamente diferente en ningún caso.

La segunda lectura de la figura 11 era en la columna que corresponde a la estimulación con LPS, se observó que entre más se aumentó la concentración de LPS, desde 1 ng/mL hasta 100 ng/mL, más se acumuló el TNF- α intracelular, lo que indicó la relación esperada de una curva de dosis-respuesta.

La tercera lectura de la figura 11 era en la columna de la coestimulación con LPS + sIgG, donde observamos también la relación dosis-respuesta. En el caso particular del histograma de la coestimulación LPS 1 ng/mL + sIgG, se observó la presencia de dos subpoblaciones de células THP-1, las de la región de la derecha que eran más responsivas que las de la región de la izquierda, este efecto se perdió cuando se aumentó la concentración a 10 y 100 ng/mL de LPS + sIgG,

lo que se interpretó como un umbral de la respuesta al LPS de todas las células THP-1 en la concentración de 10 ng/mL de LPS.

La cuarta y última lectura de la figura 11 fue cuando comparamos la estimulación con LPS contra la co-estimulación con LPS + sIgG. En todas las concentraciones evaluadas de LPS pudimos observar que siempre que co-estimulábamos con LPS + sIgG, la acumulación intracelular de TNF- α aumenta.

Los aumentos en la producción de TNF- α con la co-estimulación de LPS + sIgG comparadas con la estimulación con LPS fueron del 59% para LPS 1 ng/mL, 35% para LPS 10 ng/mL y del 31% para LPS 100 ng/mL, manteniendo en estos experimentos siempre una concentración constante de 10 μ g/mL de sIgG.

6.9. Células THP-1 no aumentaron la producción de TNF- α cuando se co-estimularon con el ligando LPG de TLR2 + sIgG

Así como hicimos con los monocitos de CMN de sangre periférica en los experimentos de la figura 7, ahora con las células THP-1 también se probó su respuesta a otros ligandos de receptores TLRs, con la finalidad de determinar si el efecto observado para LPS ligando de TLR4 se podía replicar ahora con LPG ligando de TLR2 (ya no usamos el ligando sintético P3C de TLR2 porque ya no lo tuvimos disponible) o era específico solo para LPS.

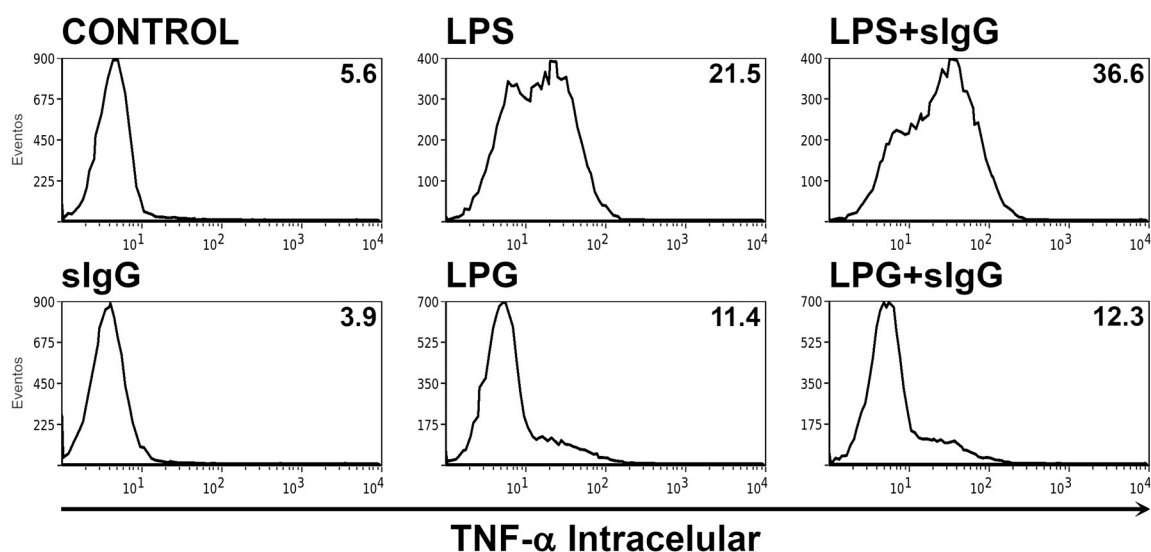


Figura 12. Acumulación intracelular de TNF- α de células THP-1 en respuesta a LPS + sIgG y LPG + sIgG. *Células THP-1 se estimularon según se indica en cada columna en presencia de BFA durante 5 h. Se detectó la acumulación de TNF- α mediante citometría de flujo. Se muestra un experimento representativo de un total de tres. Los números en los histogramas representan la intensidad media de fluorescencia Control = sin estímulo, LPS 10 ng/mL, LPG 1 μ g/mL, sIgG 10 μ g/mL.*

Pudimos observar en los experimentos de la figura 12 que la co-estimulación con LPS + sIgG respecto a la estimulación con solo LPS tuvo un aumento en la acumulación intracelular de TNF- α del 70% (de 21.5 a 36.6 MFI); pero es claro que tanto en el histograma de LPS como en el histograma de LPS + sIgG se distinguen dos poblaciones de células THP-1, que probablemente estén relacionadas con su diferente capacidad de respuesta a los estímulos.

Si ahora nos enfocamos en los paneles de la figura 12 que corresponden a la estimulación con LPG ligando de TLR2 o LPG + sIgG nos damos cuenta de que no hay diferencias en la acumulación intracelular de TNF- α , y muy notorio es que solo una pequeña población de las células THP-1 son responsivas a LPG, desafortunadamente ya no contábamos con el ligando sintético P3C de TLR2, y los resultados con LPG y LPG + sIgG no cubren los objetivos planteados para la realización de este experimento particular ya que la respuesta a LPG es baja comparada con el LPS o con P3C.

6.10. La transcripción del gen de TNF- α aumentó en células THP-1 estimuladas con LPS + sIgG

Una vez que pudimos repetir en las células THP-1 los experimentos que se hicieron previamente en monocitos de CMN de sangre periférica, y que se observaron resultados equivalentes en el inmunofenotipo y en la respuesta a los estímulos, empezamos con experimentos orientados a la descripción mecánica del aumento en la producción de TNF- α en las células THP-1 co-estimuladas con LPS + sIgG comparadas con las estimuladas con LPS, empezamos con buscar cambios a nivel de la transcripción del gen de TNF- α en respuesta a los estímulos, como lo mostramos en la figura 13 a continuación.

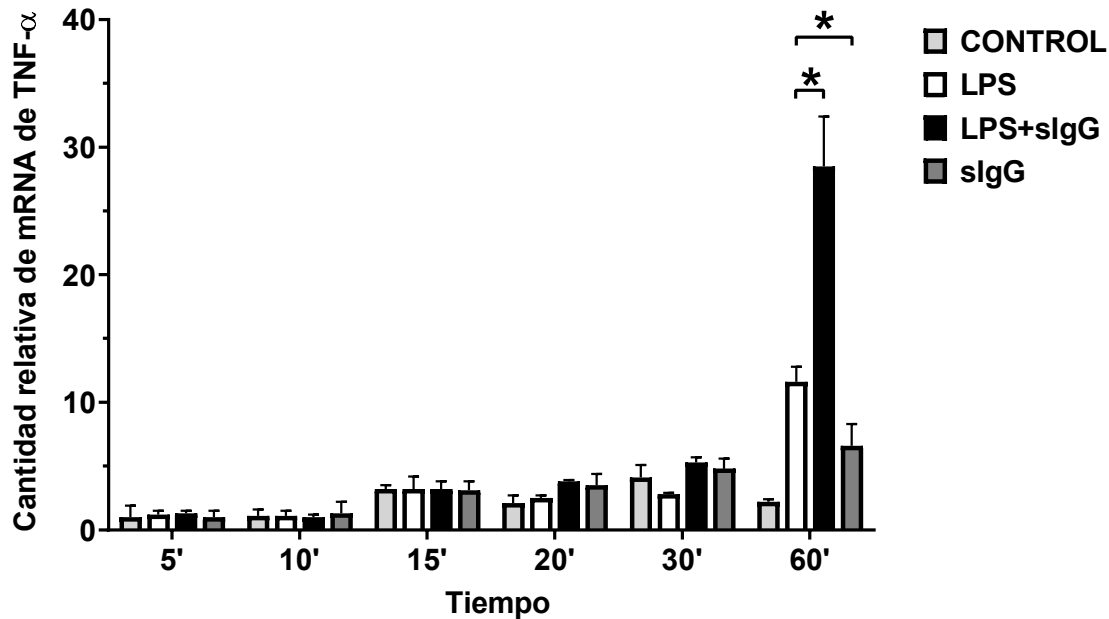


Figura 13. Curso temporal de la transcripción del gen de TNF- α en células THP-1 tras la co-estimulación con LPS + sIgG. Células THP-1 se estimularon con LPS, sIgG o ambos y el mRNA se obtuvo en los tiempos indicados. Las reacciones de q-RT-PCR se realizaron ocupando el gen de rRNA 18S como control endógeno para calcular la cantidad de mRNA de TNF- α con $n = 3$. CONTROL = células sin estimular. * $p < 0.05$.

En la figura 13 se observó el curso temporal, desde 5 min hasta 60 min, de la transcripción del gen de TNF- α en células THP-1, las cuales fueron estimuladas según lo indicado en la leyenda de la esquina superior derecha; utilizamos el rRNA 18S como control endógeno para la normalización en cada muestra.

Solo a los 60 min posteriores a la estimulación pudimos observar diferencias en la transcripción del gen de TNF- α y notamos varios efectos. El primer efecto fue un aumento significativo de 2.5 veces en la transcripción del gen de TNF- α por la co-estimulación con LPS + sIgG comparado con la estimulación solo con LPS, que contrasta con el aumento de solo el 30% de TNF- α a nivel de proteína (figura 10). El segundo efecto que se observó fue un aumento significativo de 3 veces en la transcripción del gen de TNF- α al estimular solo con sIgG comparado con el CONTROL sin estimular; resultado que no habíamos visto previamente en los experimentos realizados con las técnicas de ELISA y citometría de flujo, ya que la estimulación solo con sIgG no producía hasta el momento algún efecto detectable que fuera significativamente diferente al control sin estimular.

6.11. La translocación de la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B aumentó en células THP-1 cuando se co-estimularon con LPS + sIgG

El factor de transcripción heterodimérico NF- κ B, previa su translocación nuclear, induce la transcripción del gen de TNF- α . Detectamos la acumulación nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B, que se interpretó como la translocación nuclear del factor de transcripción. Para este fin, utilizamos una técnica de citometría de flujo modificada, donde en vez de permeabilizar células completas, permeabilizamos los núcleos de las células estimuladas e hicimos una tinción con un anticuerpo anti-NF- κ B p65-FITC, la integridad de los núcleos se observó en el microscopio mediante tinción con azul de tripano.

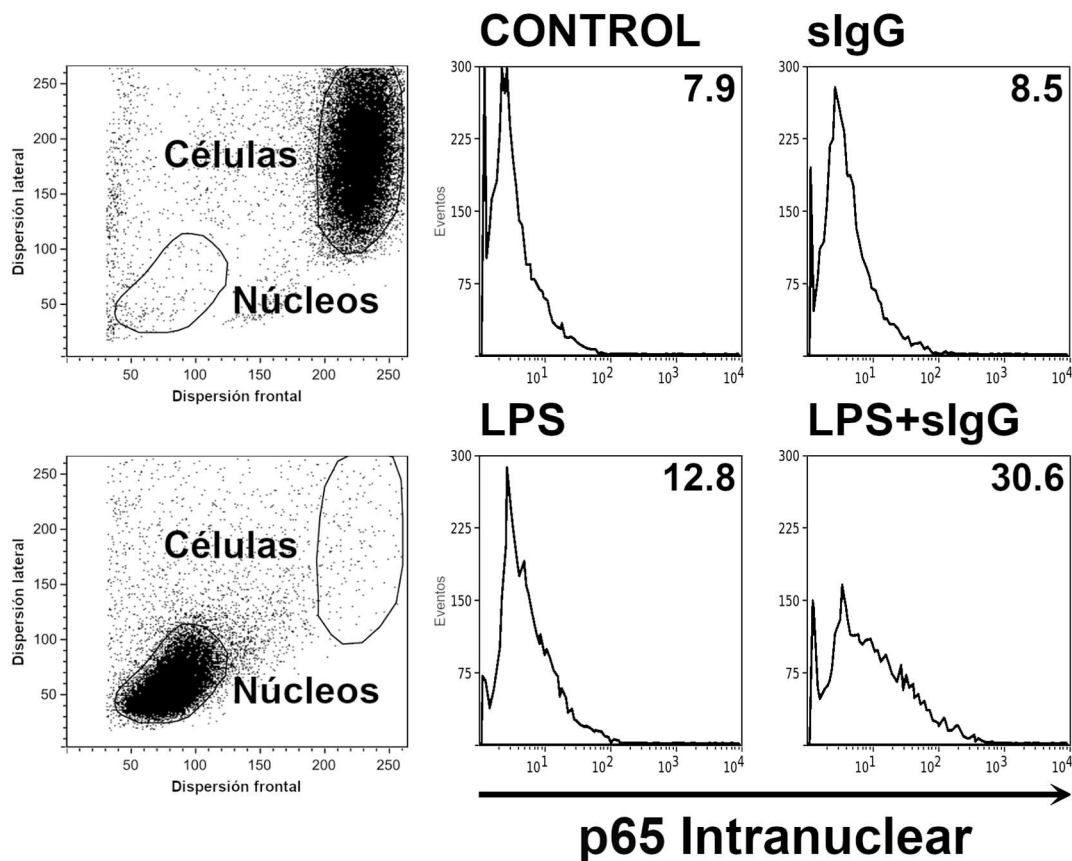


Figura 14. Aumento de la acumulación nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B en células THP-1 en respuesta a la estimulación con LPS + sIgG. Células THP-1 se activaron durante 30 min, se lisaron y sus núcleos se conservaron y tiñeron para detectar p65 intranuclear por citometría de flujo. Los gráficos de dispersión frontal y lateral muestran el patrón diferencial entre células y núcleos. Los histogramas muestran

los niveles intranucleares de p65 detectados por citometría de flujo. Los números representan la intensidad media de fluorescencia de p65. Se muestra un experimento representativo de 3 en total. C = CONTROL, células no estimuladas.

Los paneles de la primera columna de la figura 14 se muestran los patrones de dispersión frontal y dispersión lateral tanto de células completas como de los núcleos aislados, se puede observar que los núcleos se pueden diferenciar rápidamente de las células, ya que son más pequeños y menos granulares que las células; la integridad de los núcleos se revisó en el microscopio, y solo cuando la integridad nuclear estaba intacta, se hacían los experimentos.

Del lado derecho, en los histogramas de la figura 14, podemos observar que cuando las células THP-1 no fueron estimuladas o se estimularon solo con sIgG, las cantidades de NF- κ B p65 son similares con 7.9 y 8.5 de MFI respectivamente.

En el histograma de la figura 14 que corresponde a la co-estimulación con LPS + sIgG hubo un aumento de 2.4 veces en la acumulación nuclear de NF- κ B p65 al comparar con la estimulación solo con LPS, este resultado fue estadísticamente significativo al evaluar el promedio de los tres experimentos realizados (datos no mostrados). Estos resultados fueron consistentes con el aumento de 2.5 veces en la transcripción del gen de TNF- α (figura 13), cuando se co-estimuló con LPS + sIgG respecto a la estimulación solo con LPS.

6.12. La fosforilación de la subunidad p65 de NF- κ B aumentó cuando las células THP-1 fueron co-estimuladas con LPS + sIgG

En la vía de señalización para la producción de TNF- α , la subunidad p65 de NF- κ B se fosforila previamente a su translocación nuclear (figura 14), en el laboratorio detectamos la fosforilación de la subunidad p65 de NF- κ B mediante un inmunoensayo tipo Western Blot como se puede observar en la figura 15 a continuación.

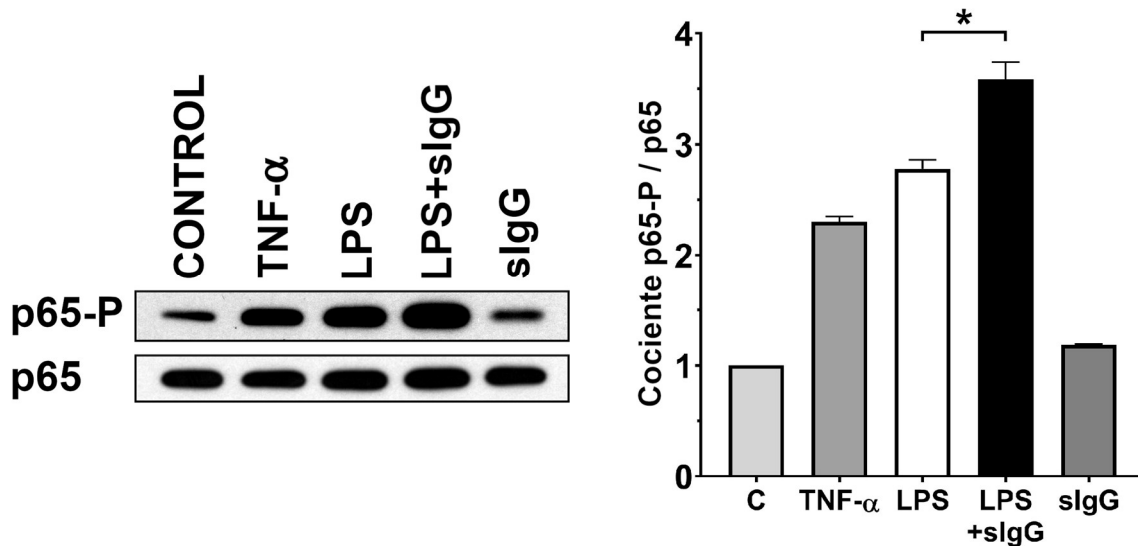


Figura 15. La co-estimulación de células THP-1 con LPS + sIgG aumentó la fosforilación de la subunidad p65 de NF-κB. Células THP-1 fueron estimuladas durante 5 min y los extractos celulares totales se usaron para detectar las proteínas fosfo-p65 y p65 mediante un inmunoensayo tipo Western Blot. Se muestra un experimento representativo de tres en total. La gráfica de barras de la derecha representa la densitometría del cociente entre fosfo-p65 sobre p65 de los 3 experimentos, la cantidad de p65 total se usó como control de carga, * $p < 0.05$.

En la parte izquierda de la figura 15 se muestra un Western Blot representativo de 3 experimentos en total, que sirvió para detectar la fosforilación de la subunidad p65 de NF-κB, en la línea inferior colocamos p65 total, que se usó como control de carga. El CONTROL correspondió a células sin estimular, y también estimulamos con el propio TNF-α, que autoinduce su producción y que usamos como control de la fosforilación de la subunidad p65 de NF-κB.

En la parte derecha de la figura 15, la gráfica de barras corresponde a la densitometría promedio de los 3 experimentos realizados, pudimos observar un 29% de aumento en la cantidad de fosfo-p65 cuando las células THP-1 se co-estimularon con LPS + sIgG comparado con la estimulación solo con LPS y ningún cambio significativo entre el control sin estimular y la estimulación solo con sIgG, los valores están normalizados a la condición control sin estimular.

6.13. $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ se degradó más rápidamente cuando las células THP-1 fueron co-estimuladas con LPS + sIgG

Hicimos experimentos para caracterizar la degradación del inhibidor $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, un evento que debe medirse en los primeros minutos después de la estimulación y que se pueden los resultados en la figura 16 a continuación.

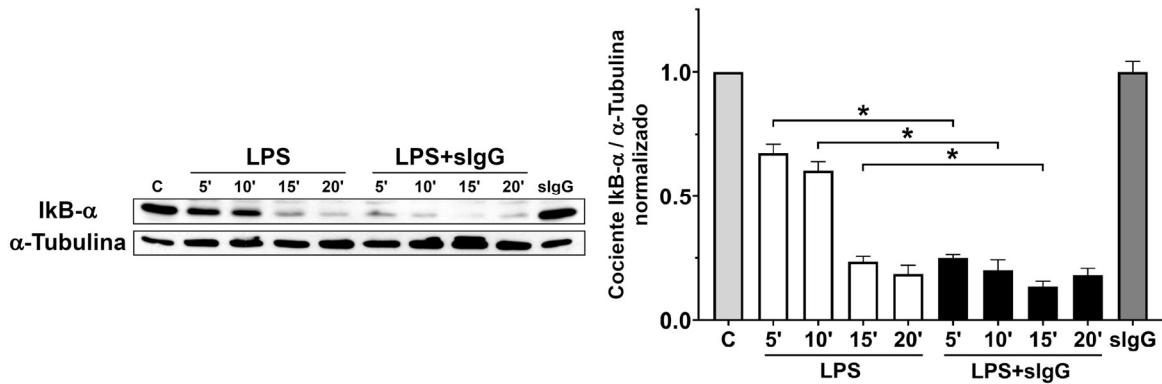


Figura 16. La coestimulación con LPS + sIgG en células THP-1 causa más degradación de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$. Células THP-1 se activaron con los estímulos que se indican y se obtuvieron extractos totales de células en los distintos tiempos mostrados. La degradación de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ se detectó mediante un inmunoensayo tipo Western Blot y se realizó la densitometría de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$. La gráfica de barras de la derecha resume los resultados de tres experimentos independientes normalizado a C = Control sin estimular, $p < 0.05$.

Un inmunoensayo tipo Western Blot representativo de tres experimentos independientes se puede observar en la figura 16 que corresponde a una cinética temporal de la degradación del inhibidor $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ de $\text{NF-}\kappa\text{B}$.

Utilizamos a la α -tubulina como control de carga. Y del lado derecho de la figura 16 se encuentra la gráfica de barras de las densitometrías de los tres experimentos realizados.

Pudimos observar que la degradación del inhibidor $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ sucede a partir de los 5 min cuando se co-estimularon las células THP-1 con LPS + sIgG. Es notable que desde este tiempo ya se llegó al máximo de la degradación del inhibidor $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$, lo que se corrobora con que, a partir de este momento, ya no son significativamente distintas entre ellas las cantidades de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ a los 10, 15 o 20 min. Es una degradación de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ prácticamente de manera inmediata.

Continuando con la cinética temporal de la figura 16, si ahora centramos nuestra atención en lo que ocurrió al estimular las células THP-1 solo con LPS, podemos ver que la degradación de I κ B- α sucedió hasta después de los 10 min posteriores a la estimulación, siendo ya indistinguibles estadísticamente las cantidades de I κ B- α a los 15 o 20 min en esta condición.

Ahora bien, si comparamos uno a uno cada tiempo entre la coestimulación con LPS + sIgG en comparación con la estimulación solo con LPS, vemos que hay diferencia estadística en los tiempos 5, 10 y 15 min.

Por otro lado, si a las células THP-1 no se les estimula (C = Control en la figura 16) o se les estimula solamente con sIgG, no se observan cambios en la degradación de I κ B- α .

6.14. Inhibidores farmacológicos de las cinasas IRAK-1/4, Syk y Akt disminuyeron la producción de TNF- α en células THP-1 que fueron estimuladas con LPS o coestimuladas con LPS + sIgG

Siguiendo con la descripción de la transducción de señales de la producción de TNF- α , decidimos inhibir farmacológicamente a las cinasas IRAK-1 e IRAK-4, indispensables para la fosforilación y posterior degradación del inhibidor I κ B- α del factor de transcripción NF- κ B; inhibimos también a las cinasas Syk y Akt, que están involucradas en la transducción de señales de la producción de TNF- α y simultáneamente participan en la vía de señalización de los Fc γ Rs.

En la figura 17A se muestra un experimento representativo de 3 realizados con células THP-1, estas fueron incubadas con un inhibidor de las cinasas IRAK-1 e IRAK-4 (IRAK Inh en la figura 17 en general) junto con BFA (figuras 17A y 17B) para inhibir el tráfico vesicular durante 1 hora previo a la estimulación con LPS, sIgG o ambas como se indica.

En la figura 17B se pueden observar el promedio de los 3 experimentos de la figura 17A, donde vimos que cuando se estimuló solo con LPS en presencia del IRAK Inh, la acumulación intracelular de TNF- α disminuyó en un 41%, pasando de una intensidad media de fluorescencia (MFI) de 13.9 sin inhibidor a 8.2 con el inhibidor, este resultado fue significativo con * $p < 0.5$ (las prueba estadísticas

en todos los casos se hicieron con los valores de MFI y después se calculó el porcentaje de cambio) y fue nuestro control de inhibición con IRAK Inh.

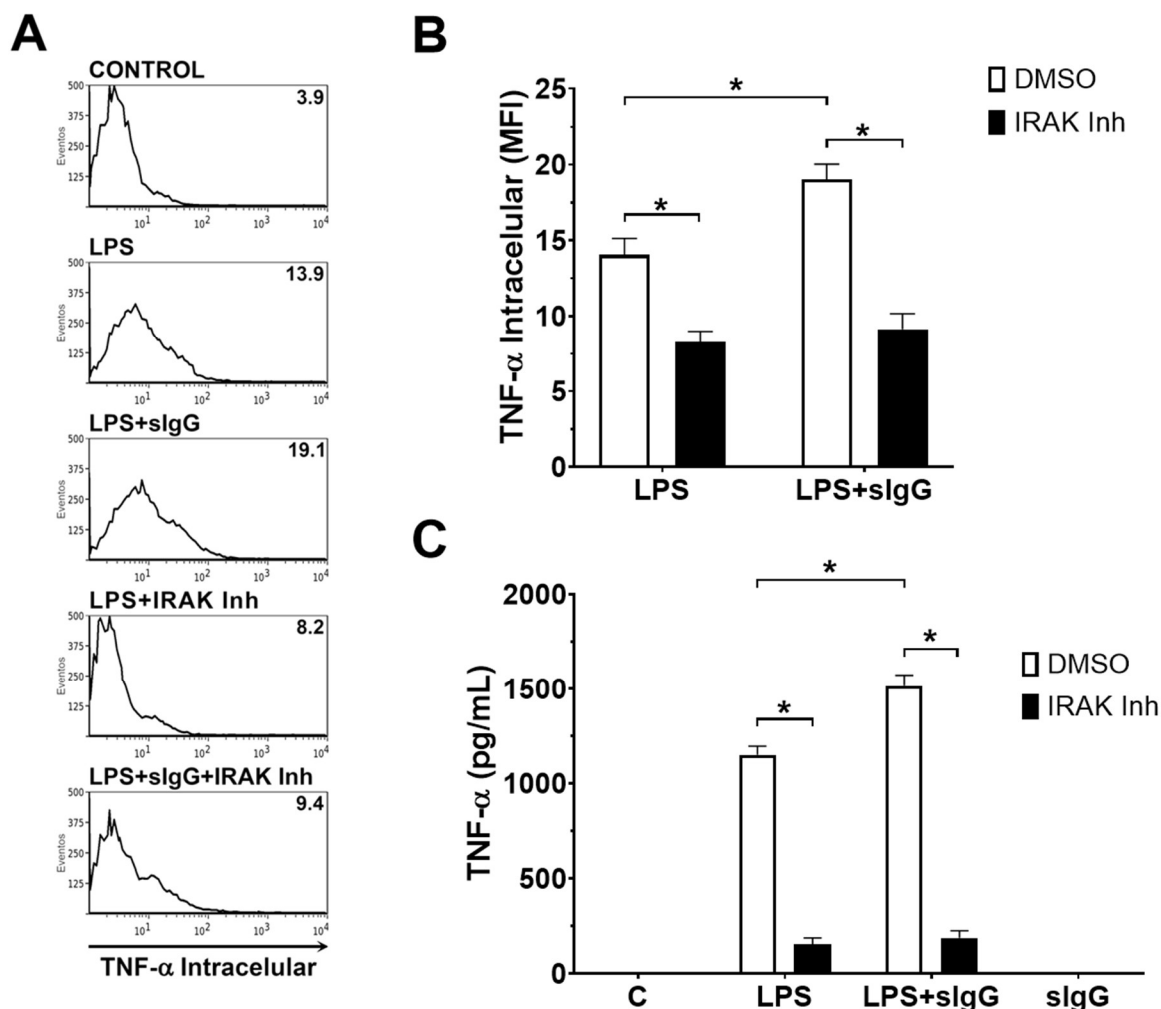


Figura 17. El inhibidor de IRAK-1 e IRAK-4 inhibió la producción de TNF- α en células THP-1 que fueron estimuladas con LPS o co-estimuladas con LPS + sIgG. (A) Experimento representativo de tres de células THP-1 que se incubaron con DMSO o inhibidor de IRAK-1 e IRAK-4 (IRAK Inh, 5 μ M) por 1 h en presencia de BFA previo a la estimulación con LPS, sIgG o ambos. El TNF- α intracelular se evaluó mediante citometría de flujo a las 5 h después de la estimulación, los números en los histogramas corresponden a la intensidad media de fluorescencia. (B) Gráfica que muestra el promedio + desviación estándar de los tres experimentos realizados en (A). (C) Células THP-1 se incubaron con DMSO o inhibidor de IRAK-1 e IRAK-4 (IRAK Inh, 5 μ M) por 1 h previo a la estimulación con LPS, sIgG o ambos. Se evaluó la producción de TNF- α en sobrenadantes a las 12 h después de la estimulación por ELISA. Las barras representan promedios + desviación estándar de 3 experimentos realizados, * $p < 0.05$, DMSO =dimetilsulfóxido, vehículo.

En la figura 17B cuando se co-estimuló con LPS + sIgG en presencia del IRAK Inh, la acumulación intracelular de TNF- α también disminuyó en un 51%, pasando de una MFI de 19.1 sin inhibidor a 9.4 con el inhibidor, siendo este un cambio significativo con $p < 0.05$.

Cuando en la figura 17B no se agregó el IRAK Inh, solo DMSO, y se comparó la estimulación con LPS y la co-estimulación con LPS + sIgG se observó un aumento significativo del 37% pasando de una MFI de 13.9 a 19.1 respectivamente; es decir, que el DMSO no alteró los resultados observados en los experimentos previos, el DMSO se usó como control porque era el disolvente del IRAK Inh.

Cuando comparamos en la figura 17B la estimulación con LPS y la co-estimulación con LPS + sIgG, ambas en presencia de IRAK Inh, ya no pudimos detectar diferencias significativas, aunque pasamos de una MFI de 8.2 para LPS a 9.4 para LPS + sIgG.

Por otro lado, en la figura 17C, realizamos experimentos similares a los descritos en la figura 17B, solo que ahora detectamos los cambios en la producción de TNF- α mediante la técnica de ELISA a las 12 h posteriores a los estímulos.

En la figura 17C, las diferencias entre agregar o no el IRAK Inh cuando se estimulan las células THP-1 con LPS o se co-estimulan con LPS + sIgG produjo una disminución del 86% y del 88% respectivamente en la producción de TNF- α , que es cuando se compara barra blanca y barra negra para el grupo de la estimulación con LPS o para el grupo de la co-estimulación con LPS + sIgG.

En la figura 17C, el aumento en la producción de TNF- α por causa de la coestimulación de las células THP-1 con LPS + sIgG es del 32% (comparando ambas barras blancas) pero se abate hasta el 21% (comparando ambas barras negras), este último valor no es significativo.

Hicimos experimentos similares a los de la ELISA de la figura 17C, pero ahora inhibiendo a las cinas Syk y Akt con inhibidores farmacológicos que denominamos por simplicidad SYK Inh y AKT Inh, que fueron incubados también por 1 h antes de la estimulación con LPS, sIgG o ambas; los dos inhibidores estaban disueltos en DMSO, por lo cual agregar DMSO solamente se usó como control, los resultados de dichos experimentos pueden observarse en la figura 18 a continuación. Todas las pruebas estadísticas se hicieron con las concentraciones de TNF- α en pg/ml y luego se calculó el porcentaje de variación.

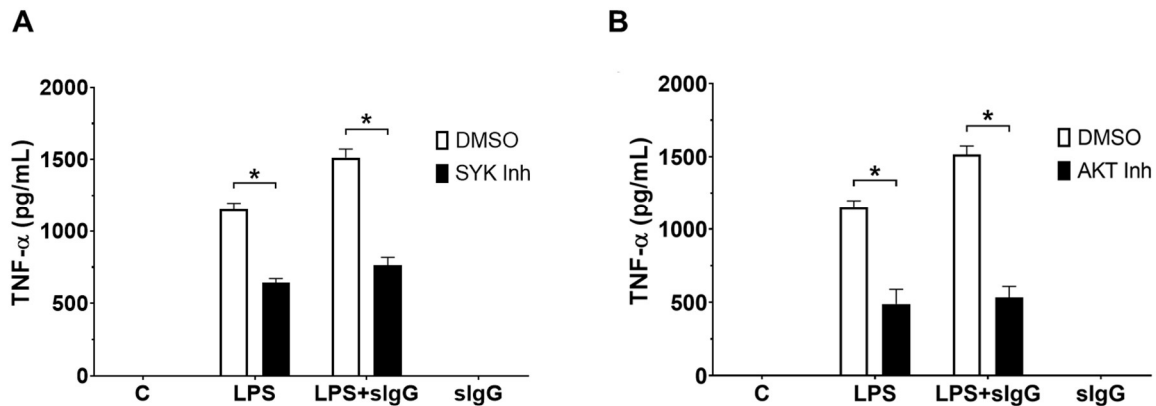


Figura 18. Los inhibidores de Syk y Akt inhibieron la producción de TNF- α en células THP-1 que fueron estimuladas con LPS o co-estimuladas con LPS + sIgG. (A) Células THP-1 se incubaron con DMSO o inhibidor de Syk (SIK Inh, 0.71 μ M) por 1 h previo a la estimulación con LPS, sIgG o ambos, y se evaluó el TNF- α en sobrenadantes por ELISA a las 12 h después de la estimulación. (B) Células THP-1 se incubaron con DMSO o inhibidor de Akt (AKT Inh, 0.73 μ M) por 1 h previo a la estimulación con LPS, sIgG o ambos, y se evaluó el TNF- α en sobrenadantes por ELISA a las 12 h después de la estimulación. En ambos paneles las barras representan promedio + desviación estándar de los 3 experimentos realizados, * $p < 0.05$, DMSO = dimetilsulfóxido. C = CONTROL, células no estimuladas.

En la figura 18A, observamos que el SYK Inh abate la producción de TNF- α en las células THP-1 que fueron estimuladas con LPS, en un 44%. Ahora bien, cuando co-estimulamos a las células con LPS + sIgG, el SYK Inh disminuyó la producción de TNF- α en un 50% (se compara barra blanca y barra negra). Y en ambos casos, la disminución es estadísticamente significativa con $p < 0.05$.

En la figura 18A también se puede ver que el aumento en la producción de TNF- α por la co-estimulación con LPS + sIgG, ya no es significativamente diferente a la de la estimulación con LPS (se comparan ambas barras negras) y el efecto potenciador inducido por la co-estimulación LPS + sIgG se pierde por completo.

Ahora bien, en la figura 18B se observó que en presencia del AKT Inh, la producción de TNF- α disminuye 58% en células THP-1 estimuladas con LPS. Si ahora las células se co-estimulan con LPS + sIgG, el AKT Inh disminuye la producción de TNF- α en 65%, esto es comparando barra blanca con barra negra, siendo este resultado significativo con * $p < 0.05$.

En la figura 18B también vemos que el efecto potenciador en la producción de TNF- α por la co-estimulación con LPS + sIgG ya no es estadísticamente diferente con respecto a la estimulación con LPS, comparando ambas barras negras, y es un resultado equivalente a lo que se observó en la figura 18A con el SYK Inh.

6.15. Resultados no publicados

En este apartado mostramos unos experimentos únicos que empezamos a realizar para continuar con la búsqueda de mecanismos asociados a la co-estimulación con LPS + sIgG en las células THP-1; empezamos indagando con la cinasa Akt e hicimos experimentos de cinética temporal, buscando determinar la activación de Akt medida como su fosforilación.

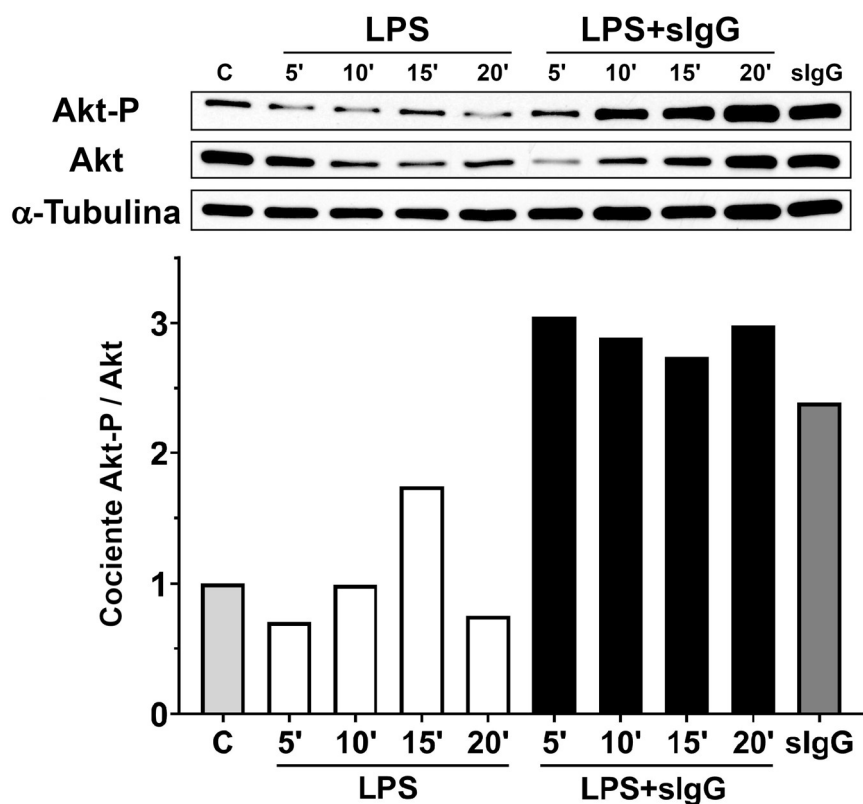


Figura P-1. Akt se activa durante la coestimulación LPS + sIgG en células THP-1. Células THP-1 se activaron con LPS o LPS + sIgG y se obtuvieron los extractos celulares en los tiempos indicados. La forma Akt-P (fosforilada) fue detectada por inmunoensayo tipo Western Blot en los extractos al igual que la forma no fosforilada Akt. $n = 1$ C = CONTROL, células no estimuladas.

En el experimento de la figura P-1 estimulamos células THP-1 con LPS o co-estimulamos con LPS + sIgG desde los 5 min y hasta los 20 min como se indica, obtuvimos extractos totales y realizamos un inmunoensayo tipo Western Blot para detectar tanto a Akt total como a la forma fosforilada Akt-P (Akt activado) y como control de carga utilizamos a α -Tubulina.

En la figura P-1, se observó que las células THP-1 tenían una cantidad de Akt-P desde el inicio, sin haber sido estimuladas todavía, que viene normalizado a 1.

Cuando las células de la figura P-1 fueron estimuladas con LPS vimos una disminución momentánea y luego un aumento en la cantidad de Akt-P.

Aunque lo más notorio de la figura P-1 es que cuando co-estimulamos a las células THP-1 con LPS + sIgG vimos un aumento en los niveles de Akt-P, desde los 5 min y hasta los 20 min observamos diferencias de hasta 3 veces más, comparados con el control sin estimular.

Incluso cuando solo estimulamos con sIgG vimos valores de Akt-P similares a cuando co-estimulamos con LPS + sIgG, que interpretamos como un efecto directo de sIgG sobre la activación de Akt.

Finalmente, inhibimos la transcripción de varios Fc γ Rs con la finalidad de repetir los experimentos, pero ahora en células THP-1 que tuvieran disminuida la cantidad de Fc γ Rs y con esto determinar si alguno de estos receptores pudiera estar involucrado en el aumento de la producción de TNF- α al co-estimular células THP-1 con LPS + sIgG.

Utilizamos la técnica de RNA de interferencia y mediante el uso de secuencias previamente reportadas en la literatura mandamos sintetizar los cebadores respectivos y estandarizamos las condiciones experimentales obteniendo los resultados que mostramos en la figura P-2.

El problema fue que no salió el control de estimulación; es decir, que no se observaron diferencias entre la estimulación con LPS y la co-estimulación con LPS + sIgG. Y como la condición ST era el control, no pudimos interpretar los otros datos de la figura P-2.

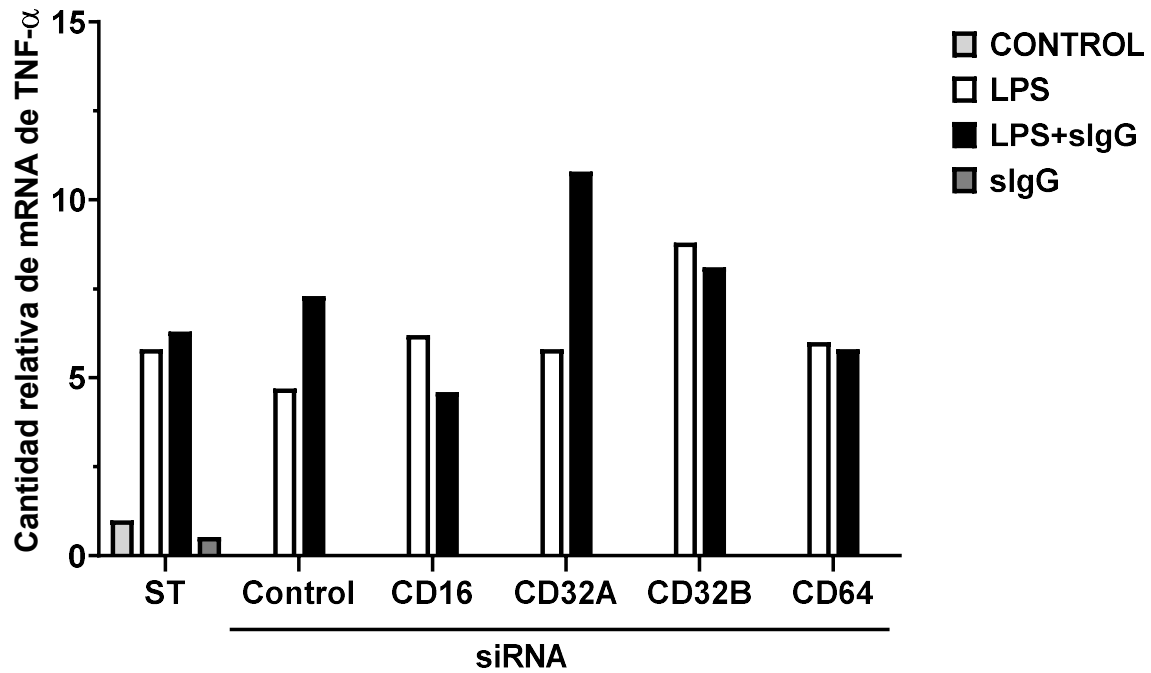


Figura P-2. Transcripción de TNF- α en células THP-1 en presencia de diferentes siRNAs. Células THP-1 fueron incubadas por 72 h en presencia de los siRNAs de los receptores Fc de IgG: CD16, CD32a, CD32b y CD64 como se indica; posteriormente las células fueron estimuladas con LPS, sIgG o ambos y se obtuvo el mRNA de TNF- α . Las reacciones de q-RT PCR se realizaron ocupando el gen de rRNA 18S como control endógeno para calcular la cantidad relativa de mRNA de TNF- α con $n = 1$. ST = Sin Tratamiento, Control = células incubadas con siRNA irrelevante.

7. Discusión

En este trabajo evaluamos la capacidad que tiene la IgG soluble (sIgG) para aumentar la producción de la citocina proinflamatoria TNF- α en células monocíticas humanas estimuladas con LPS.

Los anticuerpos del isotipo IgG se pueden encontrar en forma de monómeros, en forma de dímeros, formando complejos inmunes o en forma de agregados multiméricos inducidos por calor, estos últimos son usados como un modelo experimental de los complejos inmunes de IgG [93, 94].

Las funciones de los complejos inmunes de IgG son variadas dependiendo del tipo celular del que se trate: mejoran la presentación de antígenos en células dendríticas, inducen respuestas inmunológicas efectivas en linfocitos T, inducen la fagocitosis mediada por anticuerpos en monocitos e inducen la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos en células NK, entre otras funciones [95–97].

A nosotros nos interesaba evaluar la participación de IgG, que no formara complejos inmunes, en la producción de la citocina proinflamatoria TNF- α , pero a falta de esta IgG (que generalmente es monomérica), ocupamos IgG soluble (sIgG), que se encuentra mayormente en forma monomérica, aunque contiene en teoría alrededor de un 5% de dímeros de IgG [97], la sIgG de Sigma-Aldrich® que usamos es, en principio, equivalente a la IgG IV (intravenosa) que es ocupada clínicamente como tratamiento en enfermedades autoinmunes y se sabe que tiene efectos diferentes a los producidos por complejos inmunes de IgG [83].

También existen complejos inmunes de IgG que son solubles [98], por lo que quisimos verificar que la sIgG que estaríamos usando no se encontraba formando complejos inmunes, pero lo más importante era que buscábamos que fuera equivalente a una IgG IV de uso clínico.

Ocupamos IgG IV TEGELINE® como control, esta IgG IV es un medicamento que se utiliza como tratamiento para pacientes con enfermedades autoinmunes como la trombocitopenia inmune primaria y también se usa en pacientes con diferentes tipos de inmunodeficiencias primarias o secundarias con la finalidad de aumentar los niveles de IgG en suero para llegar a concentraciones normales [99], y lo más importante para nosotros era que se obtenía de la misma forma

que la sIgG de Sigma-Aldrich® que teníamos, a partir del liofilizado del suero sanguíneo de diez mil donadores sanos.

Determinamos el estado conformacional de sIgG con una columna de exclusión molecular mediante FPLC como lo mostramos en la figura 1 y que es una técnica habitual para la determinación de los estados conformacionales de IgG [100].

En la figura 1 podemos observar la comparación entre ambas preparaciones de IgG. La IgG IV (figura 1B) tiene únicamente 2 picos, el de 344 kDa y el de 162 kDa, que son el 6% y el 94% del contenido de proteína total y que corresponden a los pesos moleculares de los dímeros y de los monómeros de IgG respectivamente que ya han sido publicados previamente [101].

En cambio, nuestra sIgG Sigma-Aldrich® (figura 1A) tiene, además de los picos de 341 kDa y 162 kDa de los dímeros y monómeros de IgG (5% y 62% de proteína total respectivamente), otros 4 picos más pequeños que en conjunto se corresponden a fragmentos posiblemente proteicos que son menores a 5 kDa y que en conjunto representan el 33% de la proteína total restante, a pesar de que el fabricante Sigma-Aldrich® certifica que el liofilizado que vende tiene al menos el 95% de proteína IgG, este 33% de proteína de bajo peso molecular posiblemente serían fragmentos de sIgG.

Creemos que estos fragmentos de sIgG se podrían deber a la degradación de IgG en la solución debido a la temperatura o incluso variaciones de pH a la hora de preparar las muestras para el FPLC, lo cual ya ha sido reportado anteriormente en otros estudios [102–104], incluso se ha investigado acerca de la estabilidad a largo plazo de las soluciones de anticuerpos, desde 6 meses hasta 3 años y se ha encontrado que hay degradación de los mismos [105], este es el intervalo de tiempo en el que nosotros almacenábamos nuestras soluciones de sIgG. También podrían ser otras proteínas en la muestra, aunque esta solución de sIgG de Sigma-Aldrich® ha sido purificada por el fabricante, la proteína más abundante en el plasma sanguíneo es la albúmina, pero es de 67 kDa de peso molecular, muy distinto a lo que encontramos, ya que lo que observamos pesó menos de 5kDa, así que por el momento desconocemos que serían esos fragmentos.

Los experimentos que realizamos con sIgG no los hacíamos todos en el mismo momento, este dato es importante ya que se ha visto que la degradación de los anticuerpos en solución está en función del tiempo de almacenamiento [105].

Nuestros experimentos los volvíamos a realizar en diferentes ocasiones para usarlos como control en los monocitos de CMN de sangre periférica o para verificar que el fenotipo persistía en las células THP-1. No tuvimos detección de alguna respuesta distinta a la observada desde el inicio con la solución de sIgG recién preparada, por lo que razonablemente podríamos descartar el efecto de los fragmentos de bajo peso molecular, que seguramente sí variaron a lo largo del tiempo total de almacenamiento.

En cambio, donde tuvimos más inquietudes fue en lo relacionado al 5% de IgG dimérica presente en la sIgG de Sigma-Aldrich®, ya que hay reportes de actividad de estos dímeros. Dependiendo del contexto fisiológico del que se trate y el tipo de células involucradas, hay diferentes tipos de reportes en la literatura, algunos son los siguientes:

A) La IgG dimérica es incapaz de inducir desgranulación de neutrófilos in vitro o de activar al sistema de complemento [106]. B) La IgG dimérica se une a distintos receptores FcγRs que la IgG monomérica en macrófagos derivados de monocitos y macrófagos activados [107]. C) Los receptores FcγRII y FcγRIII no pueden unir ni IgG dimérica ni multimérica, pero si IgG monomérica, aunque con baja afinidad [55]. D) La IgG dimérica inhibe la fagocitosis de eritrocitos opsonizados en macrófagos M-CSF, pero no en macrófagos GM-CSF comparado con IgG monomérica [108].

No podemos saber si el efecto observado en nuestros experimentos fue por causa de los dímeros o de los monómeros de sIgG, aunque encontramos que había 12 veces menos IgG dimérica (5%) que IgG monomérica (62%) en los preparados de sIgG de Sigma-Aldrich® que usamos.

Para determinar cuál IgG está participando tendríamos que enriquecer nuestra solución con IgG monomérica y volver a hacer los experimentos para determinar si el efecto es el mismo al que reportamos con la mezcla de sIgG monomérica y dimérica. Los efectos de sIgG dimérica y sIgG monomérica son diferentes e involucran la activación de diferentes receptores FcγRs como se describe en [55].

Lo que si pudimos determinar es que nuestra sIgG de Sigma-Aldrich® es equivalente a la IgG IV TEGELINE®, que también es una mezcla de monómeros (95%) y dímeros (5%) de IgG y que se usa clínicamente. Esto es importante porque ya estaba reportado previamente que los mecanismos de acción de IgG IV son distintos a los inducidos por complejos inmunes de IgG [59]. Si no fuera

por el precio y la accesibilidad, hubiéramos usado la IgG IV TEGELINE® en vez de la sIgG de Sigma-Aldrich® que terminamos ocupando.

Sin hacer distinción, nos referiremos a la solución de IgG de Sigma-Aldrich® que ocupamos en los experimentos como sIgG (monomérica + dimérica) haciendo énfasis solo a su solubilidad, para diferenciarla de los complejos inmunes de IgG no solubles de mayor peso molecular a los observados en la figura 1.

La manera de evaluar los efectos inflamatorios de sIgG es midiendo alguna citocina proinflamatoria como TNF- α ; los monocitos, macrófagos y neutrófilos son los principales productores de TNF- α en el sistema inmunológico, aunque otros tipos celulares también pueden producirlo. Se sabe que las células no tienen reservas de TNF- α , sino que siempre lo producen después de ser estimuladas. El LPS es considerado el principal inductor de la producción de TNF- α , sin embargo, también otros antígenos virales, micóticos y parasitarios, la enterotoxina, la anafilotoxina C5a, el superantígeno, los complejos inmunes, la IL-1 β , el IFN- γ , el GM-CSF, el TGF- β e incluso el propio TNF- α por mecanismos autocrinos es capaz de inducir la expresión de más TNF- α [22].

En los experimentos de cuantificación de TNF- α por ELISA y de acumulación intracelular de TNF- α , no observamos efecto al estimular solo con sIgG, por lo que se necesitó inducir la producción de TNF- α , y lo hicimos ocupando a LPS como inductor y después lo mezclamos con sIgG para medir su efecto combinado, por lo que resultó relevante determinar que al menos todos los receptores tradicionalmente involucrados en las respuestas a LPS y sIgG estuvieran presentes en nuestros modelos experimentales, tanto en los monocitos de CMN de sangre periférica, como en las células THP-1.

Entonces mediante citometría de flujo determinamos la expresión de los correceptores de LPS, TLR4 y CD14, de los receptores Fc γ Rs de IgG, CD64, CD16 y CD32 y también del receptor TLR2, que es de la misma familia de receptores que TLR4 porque compararíamos efectos con otros ligandos inductores de la producción de TNF- α .

Con lo que respecta a los receptores TLR4 y TLR2 vimos solo una población de monocitos que expresaban cada uno de los receptores, y en general en la literatura estos resultados son los habituales [109]. En particular, el receptor CD14, además de ser parte del clúster de reconocimiento de LPS junto con el receptor TLR4 [77], es considerado un marcador de superficie de monocitos [110],

lo cual usamos para caracterizar a nuestras células como células monocíticas y en el caso de las CMN de sangre periférica, previamente inmunoseparamos con anticuerpo anti-CD14, además.

En la figura 2 de monocitos de CMN de sangre periférica, vimos que la población de células CD14+ no era homogénea, esto podría deberse principalmente a dos posibilidades.

Primero, se sabe que las poblaciones de monocitos expresan distintas cantidades de CD14 dependiendo de su estado de diferenciación, de su exposición a diferentes patógenos o incluso a diferencias étnicas de los donadores, denominando como CD14+ a los que producen menos y CD14++ a los que producen más del receptor [111].

Y en menor medida como una segunda posibilidad, la inmunoseparación magnética de CMN de sangre periférica que se hizo para la figura 2 fue con un anticuerpo anti-CD14, el cual puede interferir con el marcaje del otro anticuerpo anti-CD14 utilizado en la técnica de citometría de flujo.

El receptor CD64 conocido como Fc γ RI, se considera un marcador de monocitos al igual que CD14 y se sintetiza de manera constitutiva en estos [57, 112]. Los monocitos expresan diferentes cantidades de CD64, incluso hay una pequeña población que no rebasa el 10% que produce muy poco del receptor [113], lo cual es consistente con lo que pudimos ver en nuestros resultados de la figura 2.

Con respecto a CD32 o Fc γ RII, no contábamos con un anticuerpo que diferenciara entre CD32a y CD32b. Fisiológicamente ambos receptores tienen funciones diferentes, CD32a es un activador y CD32b es un inhibidor, esto a pesar de compartir la cadena γ y de tener en general un 85% de identidad en su secuencia de aminoácidos [114], por lo que no diferenciar entre ellos es necesariamente una limitación en la interpretación de los resultados.

Finalmente, para el receptor Fc γ RIII o CD16 está reportado que existen subpoblaciones de monocitos que se pueden clasificar según sus niveles combinados de CD14 y CD16, donde los más frecuentes en personas sanas son los CD14++/CD16- que son alrededor del 80% del total de monocitos y suelen llamarse monocitos clásicos [115]. Podemos observar similares proporciones en nuestros experimentos de la Figura 2, aunque no los tenemos clasificados en subpoblaciones monocíticas, solo las llamamos en general células monocíticas.

Con respecto a los mismos experimentos pero ahora realizados en las células THP-1 (figura 8), es importante mencionar que estas células de linaje monocítico provienen de un paciente con leucemia monocítica aguda [116], por lo cual solo sirven como un modelo de aproximación, tienen inestabilidad genética después del pasaje 25 y cada cierto tiempo teníamos que verificar que seguían expresando todos los receptores que nos interesaban, responden con menor intensidad a LPS comparadas con los monocitos de CMN de sangre periférica, y generalmente se deben diferenciar con PMA durante unas 48 h [117].

Nosotros no diferenciamos a las células THP-1 con PMA ya que nos constaba y estaba reportado que además de mejorar su respuesta a LPS, induce un aumento significativo en la producción de otras citocinas como son TNF- α , IL-1 β , IL-8 [118]. Y no deseábamos tener una posible saturación del sistema de producción de citocinas proinflamatorias, ya que precisamente eso pretendíamos medir como efecto de la coestimulación de LPS + sIgG.

Pudimos encontrar que todos los receptores que nos interesaban, CD14, TLR4, TLR2, CD64, CD32 y CD16 estaban presentes también en las células THP-1, pero ahora en cantidades homogéneas, disminuyendo con esto el grado de complejidad, ya que no se aprecian subpoblaciones de células THP-1 como en los monocitos de CMN de sangre periférica.

Para la caracterización de receptores de superficie ocupamos monocitos de CMN de sangre periférica obtenidos por inmunoseparación magnética, pero para los demás experimentos usamos CMN de sangre periférica sin inmunoseparar; por lo que teníamos una mezcla heterogénea de poblaciones celulares.

Se sabe que las células mononucleares (CMN) de sangre periférica contienen linfocitos T y B, monocitos y algunas células NK [119] y en lo que respecta a nuestros experimentos de la figura 3, detectamos por granularidad y positividad a CD14 a los monocitos, y por granularidad a los demás tipos celulares, ya que es conocido que los linfocitos tienen menor granularidad que los monocitos [120], sin que para este fin hiciéramos experimentos de tinción de marcadores de superficie de linfocitos.

Nuestra conclusión fue que solo los monocitos de las CMN de sangre periférica son capaces de producir TNF- α en respuesta al LPS, y no así los otros tipos celulares ahí presentes, que consideramos como linfocitos (figuras 3 y 4); estos experimentos eran importantes para justificar el uso de todas las CMN de sangre

periférica en vez de inmunosepararlas previamente, ya que se ha reportado que el anticuerpo anti-CD14 disminuye la respuesta a LPS [121], así que la decisión de no usar este anticuerpo en los experimentos resultaba lógico, aunque no probamos el efecto directamente.

Con respecto a los estímulos, se sabe que la concentración de IgG circulante en sangre es de alrededor de 13 g/L (8.06×10^{-2} M) [122] con variaciones relacionadas a la edad y al género de las personas [123].

En este trabajo utilizamos concentraciones de IgG de alrededor de unas 1300 veces menores a las reportadas de IgG en sangre, trabajamos en el rango de 0.01 g/L (6.2×10^{-5} M); esto debido a que, si la IgG *in vitro* se utiliza a concentraciones similares a las de la sangre, se pueden formar agregados de IgG [124], situación que podría asemejarse a complejos de IgG, que era lo que queríamos evitar, y como a 0.01 g/L ya veíamos efectos, era útil esa concentración para nosotros.

Por otro lado, la constante de disociación del receptor Fc γ RI, el de mayor afinidad reportada para Fc de IgG, es aproximadamente de 1.5×10^{-8} M [125, 126], y nosotros ocupamos concentraciones de 6.2×10^{-5} M de IgG, tres órdenes de magnitud mayores. A las concentraciones en sangre, los monocitos de CMN de sangre periférica ya tienen saturados los receptores Fc γ RI [57], y esto antes de extraerlos de los paquetes leucocitarios y de estimularlos *in vitro*, por lo que estimular a los monocitos de CMN de sangre periférica solo con sIgG no debería tener efecto, que fue como se observó en nuestros experimentos (figuras 5 y 6).

En la figura 5, con referencia a la curva de dosis-respuesta a la co-estimulación con LPS + sIgG (manteniendo LPS 10 ng/mL constante) empezamos con concentraciones de 1 μ g/mL y hasta 50 μ g/mL de sIgG y no observamos cambios, los aumentos en la producción de TNF- α los observamos a partir de los 10 μ g/mL de sIgG y después de ahí había una ligera tendencia creciente que no era estadísticamente significativa hasta el mayor valor que probamos que fue de 50 μ g/mL de sIgG.

Con las células THP-1 co-estimulamos con LPS + sIgG, mantuvimos constante la concentración de LPS a 10 ng/mL y aumentamos las sIgG hasta 100 μ g/mL sin ver un efecto mayor en la producción de TNF- α que el ya visto con 10 μ g/mL de sIgG (figura 9B), teniendo resultados consistentes con lo que se observó en los monocitos de CMN de sangre periférica. Al estimular las células THP-1 solo con sIgG también se saturarían los receptores de Fc γ RI, y según vimos a nivel de

proteína no había contribución a la producción de TNF- α (figuras de la 9 a la 12); así que, para fines prácticos, la estimulación solo con sIgG la utilizábamos como un control negativo de la producción de TNF- α .

Una cosa interesante de estos experimentos es que, salvo la tendencia ligeramente creciente, no obtuvimos una curva-dosis respuesta para sIgG cuando las células se co-estimularon con LPS + sIgG, simplemente era una respuesta de todo o nada, a concentraciones por debajo de 10 $\mu\text{g/mL}$ de sIgG no vemos ningún efecto en la producción de TNF- α y por encima de 10 $\mu\text{g/mL}$, un aumento promedio del 33% en la producción de TNF- α .

En la literatura se reporta que la IgG IV (equivalente a nuestra sIgG) tiene actividad antiinflamatoria [127] en monocitos, posiblemente bloqueando a los receptores de Fc de IgG e impidiendo la unión de complejos inmunes que inducen actividad proinflamatoria [128]. En nuestro caso, teníamos que inducir la producción de TNF- α con LPS y co-estimular simultáneamente con sIgG para observar una actividad proinflamatoria que es contraria a lo reportado previamente.

Si sIgG indujo en la co-estimulación con LPS, el aumento en la producción de TNF- α , siendo que los monocitos de CMN de sangre periférica son ya un sistema previamente saturado con sIgG, podría descartar la participación del receptor de alta afinidad Fc γ RI, aunque nuestros resultados preliminares (experimentos de una sola repetición) al inhibir Fc γ RI con siRNA en células THP-1 mostraron que se abatía el efecto potenciador de la co-estimulación con LPS + sIgG, que indicarían contradictoriamente que si participa Fc γ RI; tendríamos que realizar más experimentos al respecto, ya que además de la saturación del receptor Fc γ RI, se conoce que el mecanismo de acción de sIgG no está restringido solamente a los receptores Fc γ Rs, y se les conoce como efectos dependientes de Fab y consisten en la unión idiopática de la IgG a otros receptores como TCR α/β , Siglec-9, CD5, o a proteínas diversas como integrinas e incluso a citocinas[128].

Podríamos en un futuro utilizar solo los fragmentos Fab o Fc de IgG en los experimentos de co-estimulación con LPS, en vez de la IgG intacta y con esto determinar que fragmentos de IgG estarían participando en el aumento de la producción de TNF- α en las células monocíticas con las que trabajamos.

El LPS es el inductor de TNF- α más estudiado y es ligando del receptor TLR4, que es a su vez parte del clúster de reconocimiento de LPS que incluye al

correceptor CD14 [77]. Para el caso de los monocitos de CMN de sangre periférica, las concentraciones de LPS que se ocupan generalmente rondan entre 1 ng/mL y 10 ng/mL [129], aunque hay autores que ocupan hasta 100 µg/mL [130]. En nuestro laboratorio ocupamos 10 ng/mL de manera estándar para inducir la producción de TNF- α en los monocitos de CMN de sangre periférica y en las células THP-1 donde con 10 ng/mL de LPS ya es suficiente para inducir la producción de TNF- α [131].

Las células THP-1 que usamos no las diferenciamos con PMA, por los efectos secundarios en la producción de citocinas asociados [132], incluso hay reportes de que hasta 3,000 genes se expresan diferencialmente después de la estimulación de células THP-1 con PMA [133].

Sin diferenciar, las células THP-1 producen unas 10 veces menos TNF- α cuando las comparamos con los monocitos de CMN de sangre periférica (se puede observar al comparar la figura 9A con la figura 6A respectivamente). En nuestras condiciones experimentales pudimos determinar una curva dosis-respuesta para LPS cuando estimulábamos células THP-1 con 2 ng/mL y hasta 1250 ng/mL de LPS (barras blancas de la figura 9A y figura 11).

Vimos que por encima de los 50 ng/mL de LPS ya no podíamos detectar cambios significativos en la producción de TNF- α , lo que podría indicar que ya habíamos llegado a la saturación del sistema. Como la mitad de la producción máxima de TNF- α se alcanzaba alrededor de los 10 ng/mL de LPS, esa fue la concentración que elegimos para los estimular a las células THP-1.

Ahora bien, TLR2 es otro miembro de la familia de receptores TLR. Forma un complejo receptor heterodimérico con TLR1 o con TLR6 y también induce la producción de TNF- α con una vía de señalización prácticamente idéntica a la de TLR4-CD14 [134], por lo que usamos también algunos de sus ligandos para estudiar los efectos de la coestimulación de estos con sIgG.

Para activar a TLR2 usamos un ligando sintético, Pam3CSK4 que potencia la producción de TNF- α , el objetivo de estos experimentos era estudiar la capacidad de sIgG de modificar la producción de TNF- α en contextos de señalización similares a los inducidos por LPS y TLR4.

Cuando hicimos experimentos con monocitos de CMN de sangre periférica, no vimos ningún efecto de sIgG en la producción de TNF- α , las mismas

concentraciones de TNF- α encontrábamos si se estimulaba con Pam3CSK4 o se coestimulaba con Pam3CSK4 + sIgG (P3C en la figura 6B y en la figura 7).

Tampoco observamos ningún resultado distinto al estimular células THP-1 con otro ligando de TLR2, el lipofosfoglicano (LPG en la figura 12) o co-estimulando con LPG + sIgG; ocupamos LPG ya que no tuvimos acceso al ligando sintético Pam3CSK4.

Estos resultados pueden indicar al menos dos cosas: 1) La concentración que ocupamos de los ligandos satura el sistema, por lo que la coestimulación con sIgG ya no es detectable. O 2) La sIgG no induce ningún efecto al ser coestimulada con ligandos de TLR2.

Para poder descartar entre estas dos posibilidades se podría comenzar haciendo una curva de dosis-respuesta para los dos ligandos de TLR2 que ocupamos, tanto en monocitos de CMN de sangre periférica como en la línea celular THP-1. Lo cual no hicimos porque lo que queríamos era explorar de manera preliminar algunos efectos de sIgG en la producción de TNF- α en diferentes contextos de señalización. Cabe decir que las concentraciones que utilizamos en estos experimentos fueron las que previamente se habían utilizado en nuestro laboratorio y eran similares a lo reportado para tal efecto [135, 136].

En otro orden de ideas, es para destacar que los monocitos de CMN de sangre periférica responden con diferentes intensidades a los mismos estímulos, dependiendo del donador del banco de sangre de donde fueron aislados.

Entonces, debido a las variaciones intrínsecas en la respuesta a LPS de los diferentes donadores, para poder analizar los datos de la figura 6A correspondientes a la coestimulación con sIgG en monocitos de CMN de sangre periférica, tuvimos que hacer una comparación por parejas; es decir, que comparamos la producción de TNF- α al estimular con LPS y al coestimular con LPS + sIgG de cada donador como una pareja de datos independientes de los otros donadores, y al final determinamos el cambio promedio entre ambas condiciones experimentales, en donde observamos un aumento del 30% en la producción de TNF- α atribuible a sIgG. No sabemos si este aumento del 30% en la producción de TNF- α en los monocitos de CMN de sangre periférica sea relevante fisiológicamente.

La complejidad para determinar esta cuestión se puede ejemplificar con las siguientes observaciones en enfermedades asociadas con aumentos en los niveles de TNF- α . Por ejemplo, en pacientes con shock séptico se ha encontrado hasta 10 veces mayor cantidad de TNF- α en sangre en los pacientes que no sobreviven [137], hay otros grupos de investigación que reportan más bien que los cambios son intermedios, del orden de 2 a 3 veces mayor cantidad de TNF- α en estos pacientes [138]. Sorpresivamente también hay otros reportes que muestran que no necesariamente hay cambios en la producción de TNF- α en pacientes con shock séptico comparado con personas normales [139].

Se ha asociado la susceptibilidad y progresión del shock séptico a polimorfismos en el gen de TNF- α [140], lo cual abre la posibilidad a un abanico enorme de variaciones en los niveles de TNF- α en pacientes con shock séptico o incluso otras enfermedades relacionadas con el aumento de TNF- α como en la artritis reumatoide, donde también se ha visto que existen diferentes niveles basales de TNF- α en estos pacientes y que condicionan además su respuesta a la terapia con infliximab [141].

Las variaciones en la producción de TNF- α han llevado incluso a reexaminar el rol de TNF- α en algunas enfermedades como la esclerosis múltiple [142]. También se ha visto que en pacientes psiquiátricos diagnosticados con bipolaridad tienen hasta 5 veces más niveles de TNF- α en sangre comparados con los controles normales [143].

Por lo que no resulta trivial responder a la pregunta de si los aumentos en la producción de TNF- α que hemos observado en nuestros modelos de estudio pudieran ser fisiológicamente relevantes o no, a falta de evidencia experimental nos centramos como primera aproximación en este trabajo a la transducción de señales inducidas por la co-estimulación con LPS + sIgG.

Cuando hicimos los mismos experimentos en las células THP-1, los resultados fueron muy similares, y un resultado a considerar es que cuando co-estimulábamos con LPS + sIgG (barras negras de la figura 9A), aunque estuviéramos en la concentración de saturación con LPS a 1250 ng/mL, seguíamos viendo un aumento del 40% en la producción de TNF- α atribuible a sIgG. Lo cual podría indicarnos que la transducción de señales que se activa al estimular con LPS es diferente a cuando la activación es por la co-estimulación con LPS +sIgG. Bien podría ser que algún componente de la señalización de LPS estuviera involucrado al mismo tiempo con sIgG. A modo de hipótesis tal vez en

la superficie celular, la sIgG pudiera aumentar la capacidad de unión de LPS al clúster de reconocimiento TLR4-CD14-MD-2 [77].

Otra opción sería que sIgG se uniera a algún inhibidor de la producción de TNF- α , inhibiéndolo o bloqueándolo; por ejemplo, se ha visto que, en neutrófilos, la IgG monomérica se puede unir a los receptores Fc γ RIIa y Fc γ RIIIb impidiendo la señalización de IgG agregada que se usa para simular complejos inmunes [144].

Lo que parecen sugerir los resultados que tenemos, es que independientemente del mecanismo de acción de sIgG, se requeriría de algún componente de señalización que solo está presente cuando las células son estimuladas con LPS.

Ahora bien, tuvimos problemas técnicos con los monocitos de CMN de sangre periférica: había ocasiones en que no teníamos respuesta alguna al LPS, que es el control de activación de nuestro sistema, en otras ocasiones sin necesidad de estimular, los monocitos ya producían TNF- α en grandes cantidades, probablemente por una estimulación previa *in vivo* o durante su obtención; se ha reportado esta activación previa como producto de la variación individual, las condiciones de exposición a enfermedades de los donadores y el fondo genético de cada persona [145].

A pesar de los problemas que tuvimos al emplear monocitos de CMN de sangre periférica, pudimos observar un aumento consistente en la producción de TNF- α cuando se co-estimulaba con LPS + sIgG por diferentes técnicas demostrando así que lo observado no era un artefacto de las técnicas o que estuviera solo presente en la línea celular THP-1.

Decidimos pues repetir todos los experimentos que ya habíamos hecho con los monocitos de CMN de sangre periférica, ahora en las células THP-1, empezando por caracterizar el inmunofenotipo (figura 8) con respecto a la expresión de los receptores CD14, TLR2, TLR4, CD64, CD32 y CD16.

Además, para verificar que el cultivo de células THP-1 conservaba el mismo inmunofenotipo, repetíamos esta caracterización cada 2 semanas, aunque esta reportado en la literatura que los conservan hasta el pasaje 25 [146]. Cabe mencionar que nuestros cultivos nunca rebasaron el pasaje 20.

Otra condición que manteníamos controlada era la densidad del cultivo, para no rebasar los 5×10^5 células/mL ya que está reportado que hay cambios en la

capacidad de respuesta al LPS de las células THP-1 derivados de la densidad del cultivo [147]. Cada semana verificábamos que nuestro cultivo respondiera a LPS, y lo hacían con mayor intensidad cuando los cultivos estaban a una densidad de 1×10^6 células/mL.

Después de los controles de cultivo celular y presencia de los recetores verificamos que se pudiera reproducir el aumento en la producción de TNF- α con la coestimulación con LPS + sIgG y encontramos los mismos resultados anteriormente observados con los monocitos de CMN de sangre periférica.

Hemos discutido hasta el momento esos resultados de manera conjunta porque los experimentos eran equivalentes y para hacer notar las similitudes fenotípicas entre los monocitos de CMN de sangre periférica y las células THP-1; pero de ahora en adelante, estas últimas son las únicas de las que discutiremos sus resultados ya que no seguimos trabajando con los monocitos CMN de sangre periférica.

Se sabe que TNF- α autoinduce su producción por mecanismos autocrinos, para poder descartar efectos adicionales del TNF- α en los sobrenadantes de las células THP-1, optamos también por medir la acumulación intracelular de TNF- α , usando Brefeldina A (BFA), inhibidor del tráfico vesicular y lo medimos por citometría de flujo a las 5 h posteriores a los estímulos obteniendo los mismos resultados que consistían en un aumento del 30% en la producción de TNF- α al co-estimular con LPS + sIgG (figuras 7, 11 y 12).

Habiendo establecido que el efecto de la co-estimulación con LPS + sIgG era equivalente en los monocitos de CMN de sangre periférica y en la línea celular THP-1, nos propusimos describir si había cambios en eventos transduccionales asociados a la estimulación por LPS.

Por eso, nos enfocamos en los eventos corriente arriba en la señalización, midiendo para esto el mRNA de TNF- α . Se ha reportado en diferentes condiciones experimentales que los niveles máximos de mRNA de TNF- α al estimular monocitos con LPS se encuentran entre 30 min y 2 h después de la estimulación [148, 149].

Sabiendo esto, hicimos una curva temporal de la transcripción de TNF- α (figura 13), donde observamos que una hora después de la estimulación obteníamos un

aumento de 2.5 veces en la cantidad de mRNA de TNF- α en la co-estimulación con LPS + sIgG, comparando con la estimulación solo con LPS.

Al mismo tiempo fueron los únicos experimentos estadísticamente significativos donde pudimos detectar un efecto en la estimulación solo con sIgG, que correspondía al 56% de la transcripción de TNF- α inducida por LPS.

Sabemos que estos resultados no corresponden a los aumentos del 30-40% que detectamos en la acumulación intracelular o en los sobrenadantes de TNF- α ; estas variaciones podrían explicarse por la regulación transcripcional o postranscripcional durante la biosíntesis de TNF- α .

Por ejemplo, la región 3' UTR (región no traducible) del gen de TNF- α tiene un ARE (elemento rico en AU) que está implicado en la regulación transcripcional y que desestabiliza su mRNA, y estabilizarlo requiere de la activación de la vía de señalización de p38 MAPK que incrementa la producción de TNF- α [150, 151].

La conclusión al respecto en nuestros experimentos se centra en que la coestimulación con LPS + sIgG incrementa la actividad transcripcional de TNF- α , aunque esto no se vea reflejado en la producción de la proteína. Y que la activación de la transcripción de TNF- α por causa solamente de sIgG no se observó en la traducción y secreción de TNF- α .

Siguiendo con los eventos corriente arriba, nos enfocamos en la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B que participa en la transcripción del gen de TNF- α [152], este debe ser translocado al núcleo, que en los monocitos y macrófagos sucede en un solo evento de larga duración [153] a diferencia de los patrones de oscilación que se pueden observar en fibroblastos [154].

Nosotros pudimos detectar la translocación de NF- κ B p65 del citoplasma al núcleo en 30 min en las células THP-1. La detección de NF- κ B p65 nuclear se hizo utilizando citometría de flujo para núcleos como se explica en la sección de materiales y métodos. La coestimulación con LPS + sIgG aumenta en 2.4 veces la translocación nuclear de NF- κ B p65, que directamente se correlaciona el aumento que detectamos a nivel transcripcional.

Es decir, que sIgG podría estar utilizando elementos transduccionales comunes a los de la vía canónica inducida al estimular solo con LPS.

En esa misma línea argumental de buscar elementos de la vía canónica seguimos explorando corriente arriba en la señalización hacia la fosforilación de NF- κ B p65. La fosforilación de NF- κ B p65 en la serina 536 (S536) está reportado que ocurre al estimular monocitos y macrófagos con LPS [155] y es la fosforilación más descrita al respecto [156], también hay otros reportes que indican que la fosforilación en S536 funciona como un regulador negativo de NF- κ B [156], aunque de manera moderada.

Nosotros detectamos que en las células THP-1 había un aumento del 29% en la fosforilación de S536 de NF- κ B como respuesta a la coestimulación con LPS + sIgG (figura 15) y correlaciona con nuestros datos acerca del aumento de la translocación de NF- κ B, la transcripción y traducción de TNF- α , mostrado respectivamente en las figuras 14, 13 y 10.

En este punto ya pudimos preguntarnos acerca de las diferencias en las vías de activación de NF- κ B, porque la fosforilación en la S536 de p65 se ha reportado generalmente que se debe a la cinasa IKK- β . Es importante recalcar que la participación de IKK- β se considera como parte de la vía de señalización canónica en la activación de NF- κ B [155, 157].

Cabe mencionar que existen reportes que muestran que en realidad la fosforilación en S536 de NF- κ B p65 lo realiza la cinasa IKK- α [158], siendo esta una cuestión abierta y controversial que constituye un área de oportunidad para determinar por cual opción podría estar ocurriendo la respuesta a la coestimulación con LPS + sIgG. La activación de IKK- α se asocia tradicionalmente a la activación por factores de crecimiento.

Después de la estimulación con LPS, IKK- β se encarga de fosforilar a miembros de la familia de inhibidores de NF- κ B, particularmente a I κ B- α , su fosforilación induce su propia ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma [159].

Hicimos una curva temporal para medir precisamente la degradación de I κ B- α en respuesta a la coestimulación con LPS + sIgG comparando con la estimulación con LPS solamente que se puede observar en la Figura 16.

Lo que consideramos más importante fueron los tiempos en los que sucede la degradación de I κ B- α al coestimular las células THP-1 con LPS + sIgG.

El efecto es observable a partir de los 5 min posteriores a la coestimulación, lo que indica que la respuesta a LPS + sIgG es una respuesta temprana aún más corriente arriba que la degradación de I κ B- α .

Al final de la curva temporal, a los 20 min, los niveles de I κ B- α ya eran equivalentes entre la coestimulación con LPS + sIgG y la estimulación con LPS, esto no es suficiente para explicar los resultados previos en el aumento de la producción de TNF- α , y nos invita a pensar que están involucrados otros procesos con otras I κ Bs además de I κ B- α que fue la que evaluamos, consistente con lo que se ha observado en otros estudios [160–162].

Por último, exploramos la actividad de las cinasas involucradas con la fosforilación y posterior activación del complejo IKK en la señalización inducida por LPS, particularmente IRAK-1 e IRAK-4 [163], con la finalidad de encontrar alguna diferencia entre las respuestas a la estimulación con LPS y la coestimulación con LPS + sIgG.

El inhibidor que utilizamos inhibe a ambas cinasas IRAK-1/4 y en las concentraciones que ocupamos lográbamos disminuir la producción de TNF- α hasta en un 41% al estimular con LPS (figura 17A), y abatimos el efecto de la coestimulación con LPS + sIgG a la mitad, pero esto solo fue detectable en la acumulación intracelular de TNF- α a las 5 h (figura 17A) y no pudimos detectar ningún otro cambio en la cantidad de TNF- α en los sobrenadantes de las células THP-1 a las 12 h posteriores a los estímulos (figura 17B) ya que la nivel de inhibición en ambas condiciones fue del 86% y 88% para la estimulación con LPS o coestimulación con LPS + sIgG respectivamente.

Cabe resaltar que utilizamos concentraciones más bajas de las recomendadas [164] con la finalidad de poder discernir entre los efectos de la estimulación con LPS y la coestimulación con LPS + sIgG. Aún bajo esta reducción de concentración del inhibidor estaríamos aun limitados en nuestra interpretación, ya que el inhibidor también inhibe a otras 27 cinasas según menciona Calbiochem® el fabricante, aunque a concentraciones mucho mayores de las que ocupamos en nuestros experimentos.

Así que estos experimentos con inhibidores farmacológicos los consideramos como una primera aproximación a las posibles cinasas involucradas en el aumento en la producción de TNF- α inducida por LPS + sIgG en monocitos.

Siguiendo esta misma idea de la aproximación inicial decidimos estudiar ahora la actividad de la cinasa Syk, que se ha reportado que tiene múltiples funciones en las respuestas de células hematopoyéticas y que está involucrada de manera esencial en la transducción de señales de receptores Fc de IgG [165].

La cinasa Syk está involucrada también en la señalización inducida por LPS, mediante la unión al dominio citoplasmático de TLR4, esta unión incrementa la dimerización de TLR4 en monocitos, macrófagos y neutrófilos [80]. La activación de la cinasa Syk en células de la línea THP-1 también está bien documentada [166].

Se ha visto que Syk puede controlar la actividad funcional de la cinasa IRAK-1 controlando la expresión del adaptador MyD88 o mediante la inhibición de la transcripción de IRAK-1 [167], ambos componentes esenciales de la señalización canónica de TLR4 inducida por LPS.

Incluso, de lo más interesante es que se ha encontrado que Syk co-immunoprecipita con TLR4 en ausencia incluso de LPS o algún otro estímulo [168].

Cuando hicimos experimentos de inhibición farmacológica de Syk (Figura 18A) observamos que al inhibir a Syk disminuye en un 44% el TNF- α inducido por LPS, y el aumento en la producción de TNF- α por causa de la coestimulación con LPS + sIgG se abate por completo.

La pérdida del aumento en la producción de TNF- α atribuible a sIgG podría estar relacionado con la cinasa Syk, incluso se ha reportado que al disminuir la transcripción de Syk mediante siRNA, la producción de citocinas proinflamatorias disminuye en células epiteliales de pulmón humanas estimuladas con TNF- α [169].

Con nuestros resultados no podríamos relacionar el efecto observado con sIgG, ya que el efecto de Syk se podría considerar parte de la señalización habitual en la producción de TNF- α inducida por LPS [168], y además algunos trabajos indican que los inhibidores farmacológicos de Syk podrían estar inhibiendo de manera inespecífica a TLR4 [170].

En nuestros resultados, el efecto de sIgG combinado con LPS está relacionado con un efecto dependiente a la activación con LPS; entonces, la sola disminución

de la producción de TNF- α inducida por LPS por causa del inhibidor de Syk explicaría los resultados observados.

Una manera de determinar la participación de Syk en la producción de TNF- α inducida por la coestimulación con LPS + sIgG podría ser detectando el estado de fosforilación de Syk que está relacionado con su estado de activación [165], o midiendo la liberación de Ca²⁺ como un efecto clásico de la activación de Syk y que se ha relacionado también con la capacidad de exocitosis de TNF- α [171].

Los últimos experimentos que hicimos con inhibidores farmacológicos, fueron para la cinasa Akt. Se sabe que la activación de TLR4 por LPS activa a su vez a la cinasa PI3K [172], que de manera clásica induce la activación de Akt.

Se ha reportado que Akt puede inhibir la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α pero también que puede activar su producción [173], haciendo de la intervención de Akt en la señalización de TLR4 un fenómeno no descrito totalmente.

Al inhibir farmacológicamente a Akt vimos que se abatía la producción de TNF- α inducida al estimular solo con LPS en un 58% (Figura 18B) y también se perdía el efecto observado al coestimular con LPS +sIgG, metiéndonos en el mismo dilema que tuvimos al utilizar los inhibidores de IRAK-1/4 y Syk, solo concluyendo que Akt podría estar involucrado en la producción de TNF- α inducida por LPS, pero sin poder entender si estaba relacionado con el aumento en la producción de TNF- α asociada a la coestimulación con LPS + sIgG,

En futuros experimentos podríamos hacer una curva de dosis-respuesta de los inhibidores y usando concentraciones más bajas para ver si podemos esta vez visualizar algún cambio.

Una vez que terminamos con nuestras primeras aproximaciones a la transducción de señales de la producción de TNF- α inducida por LPS, seguimos ahora averiguando el estado de activación de Akt en células THP-1.

Al activarse el receptor TLR4 con LPS, se recluta a Syk, que puede ahora unirse directamente a la subunidad p85 α de PI3K y activarla, entonces PI3K produce PIP₃ y se activa la cinasa PDK1, que fosforila a Akt1 en la treonina 308, faltando aún otra fosforilación en la serina 473 que es realizada a su vez por TORC2 y

DNA-PK que, finalmente aumenta de manera significativa la actividad enzimática de Akt1 [165, 174].

Los resultados que obtuvimos son de un solo experimento, por eso no los publicamos, detectamos la fosforilación de Akt1 en la serina 473, mostrado en la figura P-1, lo primero que observamos es que Akt1 ya se encuentra basalmente fosforilada en la serina 473 en el control sin estimular.

Al estimular con LPS, no vimos diferencias claras en el estado de fosforilación de Akt comparadas con el control sin estimular, pero cuando coestimulamos las células THP-1 con LPS + sIgG, detectamos un aumento de 2 a 3 veces en la cantidad relativa de Akt1 fosforilada, pero estas cantidades son similares cuando se estimula únicamente con sIgG.

Lo que abre la posibilidad de que la fosforilación de Akt1 se deba a un efecto directo de sIgG de manera independiente a LPS, lo cual podría explicar parcialmente nuestros resultados previos donde observábamos un aumento en la cantidad del mRNA de TNF- α al estimular únicamente con sIgG (figura 13) y que también se ha visto en otros estudios, pero contrastantemente dependiendo de la activación por LPS [175], tal vez incluso ambas cosas pudieran estar sucediendo en nuestro modelo de estudio.

El último experimento que hicimos fue para explorar el rol que podrían tener los receptores Fc de IgG en la respuesta a LPS + sIgG. Se sabe que IgG monomérica solo es reconocida por el receptor de alta afinidad Fc γ RI o CD64 [176]. Pero no sabíamos si el aumento en la producción de TNF- α en respuesta a la coestimulación con LPS + sIgG que observamos a lo largo de este estudio en realidad pudiera estar relacionado con las vías de transducción habituales de los receptores Fc γ R. Entonces, toda vez que desde el principio de este trabajo ya habíamos determinado la presencia en la superficie celular de los receptores Fc γ R: CD64, CD32 y CD16 en las células THP-1, entonces iniciamos con la exploración de los efectos de inhibir la transcripción de los Fc γ Rs mencionados mediante la técnica de siRNAs.

Hicimos experimentos de citometría de flujo para determinar la cantidad de los Fc γ Rs en la superficie de las células THP-1 que fueron tratadas con los siRNAs para demostrar que la inhibición de los receptores si se llevaba a cabo, pero no las mostramos en el apartado de resultados ya que se perdieron los archivos de adquisición originales del citómetro de flujo.

Nuestro problema en estos experimentos fue que la condición ST (sin tratamiento) no era consistente con los experimentos previos que teníamos y que mostramos en la figura 13. De ese experimento solo nos pareció interesante que en las células tratadas con el siRNA de CD32A, donde se aumentó al doble la cantidad de mRNA de TNF- α , sin que este resultado pudiera relacionarse con sIgG, ya que como vimos en el control ST, la sIgG no tenía efecto. Estos experimentos, esencialmente solo se utilizaron para la estandarización de la técnica de inhibición por siRNAs.

Aunque no tenemos claro un contexto biológico directamente relacionado con la respuesta de los monocitos a la co-estimulación con LPS + sIgG a bajas concentraciones (1300 veces menores a la plasmática), creemos que esta respuesta podría estar relacionada con los tejidos, más que con la circulación sanguínea, donde se cree que hay concentraciones nano y micro molares de sIgG [177] y donde los monocitos patrulleros [178] bien podrían encontrarse en condiciones patológicas de co-estimulación con LPS + sIgG, lo cual podría generar una respuesta inflamatoria aumentada en respuesta a las bacterias Gram negativas invasoras ahí presentes.

Otra de las ideas de utilizar concentraciones relativamente bajas de sIgG fue la de encontrar una vía de señalización que fuera específica, para diferenciar nuestras observaciones de las reportadas a concentraciones elevadas de IgG IV (50 g/L, 3.8 veces más que la concentración en sangre y 5000 veces mayor a la concentración que usamos nosotros) y que nosotros usamos como referencia. Por lo cual, a nivel de señalización abriría las puertas a la descripción de otras vías de control de la producción de citocinas, y la relación de los receptores Fc γ Rs en estos contextos de baja concentración de sIgG, tal vez podrían ser otras nuevas vías de señalización involucradas.

8. Conclusiones

- Monocitos de CMN de sangre periférica y células THP-1 co-estimuladas con LPS + sIgG aumentan la producción de TNF- α en un 30% cuando se comparan con la estimulación solo con LPS.
- Monocitos de CMN de sangre periférica y células THP-1 estimuladas con sIgG no inducen la producción de TNF- α .
- El aumento en la producción de TNF- α al co-estimular monocitos de CMN de sangre periférica y células THP-1 se detecta solo cuando se usa LPS + sIgG y no con otros ligandos de TLR2 + sIgG, aunque la estimulación con los ligandos de TLR2 induzca por sí misma la producción de TNF- α .
- Aumenta la transcripción de TNF- α , la fosforilación y translocación del factor de transcripción NF- κ B al coestimular células THP-1 con LPS + sIgG comparado con solo estimular con LPS hasta en 2.5 veces.
- En las células THP-1, estimular con sIgG únicamente induce la transcripción de TNF- α , aunque eso no se refleja en la acumulación intracelular o secreción a nivel de proteína de TNF- α .
- Existen diferencias en la señalización temprana mediada por I κ B- α , siendo su degradación acelerada, en la co-estimulación con LPS + sIgG en células THP-1 comparado con la estimulación solo con LPS.

9. Perspectivas

Probablemente la limitación más importante de este trabajo es no haber valorado el efecto de las porciones Fc y Fab por separado y el efecto de los dímeros de IgG en la respuesta a la coestimulación con LPS + sIgG.

La separación en fragmentos Fab y Fc permitiría distinguir en definitiva que región de los anticuerpos solubles es responsable del efecto observado de aumento en la producción de TNF- α por la co-estimulación con LPS + sIgG.

Convendría comenzar a estudiar a detalle el fenómeno observado en nuestro trabajo con las siguientes directrices:

- 1) Utilizar solo la fracción monomérica de la IgG soluble, en vez de la combinación IgG monomérica + dimérica utilizada hasta el momento.
- 2) Determinar si el efecto observado con sIgG se debe a la región Fab o a la región Fc.
- 3) Comparar el efecto observado de sIgG con complejos inmunes o agregados de IgG.
- 4) Estudiar la co-estimulación de IgG con otros ligandos que induzcan la producción de TNF- α .
- 5) Evaluar la producción de otras citocinas, pro o antiinflamatorias en la respuesta a la co-estimulación con sIgG
- 6) Evaluar la participación de receptores Fc de IgG mediante siRNAs, entrecruzamiento con fragmentos Fab, movilización de Ca²⁺ o fagocitosis.
- 7) Evaluar la activación de diversas cinasas involucradas en la producción de TNF- α , como Syk o Akt.
- 8) Encontrar un contexto fisiológico en donde estas observaciones pudieran tener una relevancia clara.

10. Referencias

1. Vargas-Hernández, O., Ventura-Gallegos, J. L., Ventura-Ayala, M. L., Torres, M., Zentella, A., & Pedraza-Sánchez, S. (2020). THP-1 cells increase TNF- α production upon LPS + soluble human IgG co-stimulation supporting evidence for TLR4 and Fc γ receptors crosstalk. *Cellular Immunology*, 355(104146), 104146. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104146>
2. Mogensen, T. H. (2009). Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 240–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>
3. Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *International Reviews of Immunology*, 30(1), 16–34. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>
4. Kigerl, K. A., de Rivero Vaccari, J. P., Dietrich, W. D., Popovich, P. G., & Keane, R. W. (2014, August). Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Experimental Neurology*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.01.001>
5. Mukherjee, S., Huda, S., & Sinha Babu, S. P. (2019). Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. *Scandinavian Journal of Immunology*, 90(1). <https://doi.org/10.1111/sji.12771>
6. Takeda, K., & Akira, S. (2015). Toll-Like Receptors. *Current Protocols in Immunology*, 109(1), 14.12.1-14.12.10. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1412s109>
7. Nijland, R., Hofland, T., & van Strijp, J. (2014). Recognition of LPS by TLR4: Potential for Anti-Inflammatory Therapies. *Marine Drugs*, 12(7), 4260–4273. <https://doi.org/10.3390/md12074260>
8. van Amersfoort, E. S., van Berkel, T. J. C., & Kuiper, J. (2003). Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 379–414. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.379-414.2003>
9. Akira, S. (2000). Toll-like receptors: lessons from knockout mice. *Biochemical Society Transactions*, 28(5), 551–556. <https://doi.org/10.1042/bst0280551>

10. Finberg, R. W., & Kurt-Jones, E. A. (2006). CD14: Chaperone or Matchmaker? *Immunity*, *24*(2), 127–129. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.01.010>
11. JERALA, R. (2007). Structural biology of the LPS recognition. *International Journal of Medical Microbiology*, *297*(5), 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.04.001>
12. Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J. A., & Segal, D. M. (2001). Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(21), 12156–12161. <https://doi.org/10.1073/pnas.211445098>
13. Maeshima, N., & Fernandez, R. C. (2013). Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00003>
14. Awasthi, S. (2014). Toll-like receptor-4 modulation for cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, *5*(JUL), 328. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00328>
15. Takeda, K., & Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*, *16*(1), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2003.10.003>
16. Pfeffer, K. (2003). Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *14*(3–4), 185–191. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(03\)00022-4](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(03)00022-4)
17. Suo, F., Zhou, X., Setroikromo, R., & Quax, W. J. (2022). Receptor Specificity Engineering of TNF Superfamily Ligands. *Pharmaceutics*, *14*(1), 181. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010181>
18. Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q., & Griendling, K. K. (2018). Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circulation Research*, *122*(6), 877–902. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311401>
19. Baud, V., & Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology*, *11*(9), 372–377. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)02064-5](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02064-5)
20. Jang, D., Lee, A.-H., Shin, H.-Y., Song, H.-R., Park, J.-H., Kang, T.-B., ... Yang, S.-H. (2021). The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics.

International Journal of Molecular Sciences, 22(5), 2719.
<https://doi.org/10.3390/ijms22052719>

21. Montfort, A., Colacios, C., Levade, T., Andrieu-Abadie, N., Meyer, N., & Ségui, B. (2019). The TNF Paradox in Cancer Progression and Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 10(JULY), 1818. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01818>
22. Zelová, H., & Hošek, J. (2013). TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflammation Research*, 62(7), 641–651. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0633-0>
23. Parameswaran, N., & Patial, S. (2010). Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. *Critical ReviewsTM in Eukaryotic Gene Expression*, 20(2), 87–103. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v20.i2.10>
24. Wajant, H., & Siegmund, D. (2019). TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7(May), 91. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00091>
25. Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(1), 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
26. Verstak, B., Nagpal, K., Bottomley, S. P., Golenbock, D. T., Hertzog, P. J., & Mansell, A. (2009). MyD88 Adapter-like (Mal)/TIRAP Interaction with TRAF6 Is Critical for TLR2- and TLR4-mediated NF- κ B Proinflammatory Responses. *Journal of Biological Chemistry*, 284(36), 24192–24203. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.023044>
27. Chen, L., Zheng, L., Chen, P., & Liang, G. (2020). Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88 (MyD88): The Central Hub of TLR/IL-1R Signaling. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(22), 13316–13329. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00884>
28. Brenke, J. K., Popowicz, G. M., Schorpp, K., Rothenaigner, I., Roesner, M., Meininger, I., ... Jürjens, G. (2018). Targeting TRAF6 E3 ligase activity with a small-molecule inhibitor combats autoimmunity. *Journal of Biological Chemistry*, 293(34), 13191–13203. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA118.002649/ATTACHMENT/AFF5C63E-52FF-4CAC-A947-39857734BFF2/MMC1.PDF>
29. Gohda, J., Matsumura, T., & Inoue, J. (2004). Cutting Edge: TNFR-Associated Factor (TRAF) 6 Is Essential for MyD88-Dependent Pathway but Not Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor-Inducing IFN- β

- (TRIF)-Dependent Pathway in TLR Signaling. *The Journal of Immunology*, 173(5), 2913–2917. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.2913>
30. Broglie, P., Matsumoto, K., Akira, S., Brautigan, D. L., & Ninomiya-Tsuji, J. (2010). Transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1) kinase adaptor, TAK1-binding protein 2, plays dual roles in TAK1 signaling by recruiting both an activator and an inhibitor of TAK1 kinase in tumor necrosis factor signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*, 285(4), 2333–2339. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.090522>
 31. Israel, A. (2010). The IKK Complex, a Central Regulator of NF- κ B Activation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(3), a000158–a000158. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000158>
 32. Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., ... Akira, S. (2005). Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nature immunology*, 6(11), 1087–1095. <https://doi.org/10.1038/NI1255>
 33. Goral, J., & Kovacs, E. J. (2005). In Vivo Ethanol Exposure Down-Regulates TLR2-, TLR4-, and TLR9-Mediated Macrophage Inflammatory Response by Limiting p38 and ERK1/2 Activation. *The Journal of Immunology*, 174(1), 456–463. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.1.456>
 34. Bode, J. G., Ehrling, C., & Häussinger, D. (2012). The macrophage response towards LPS and its control through the p38MAPK–STAT3 axis. *Cellular Signalling*, 24(6), 1185–1194. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.018>
 35. Schreiber, J., Jenner, R. G., Murray, H. L., Gerber, G. K., Gifford, D. K., & Young, R. A. (2006). Coordinated binding of NF- κ B family members in the response of human cells to lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(15), 5899–5904. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510996103>
 36. Oeckinghaus, A., & Ghosh, S. (2009). The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(4), a000034–a000034. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000034>
 37. Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2004). Signaling to NF- κ B. *Genes & Development*, 18(18), 2195–2224. <https://doi.org/10.1101/gad.1228704>
 38. Vázquez-Carballo, C., Guerrero-Hue, M., García-Caballero, C., Rayego-Mateos, S., Opazo-Ríos, L., Morgado-Pascual, J. L., ... Moreno, J. A. (2021).

- Toll-Like Receptors in Acute Kidney Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 816. <https://doi.org/10.3390/ijms22020816>
39. Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5), 373–384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>
 40. Clark, K., Takeuchi, O., Akira, S., & Cohen, P. (2011). The TRAF-associated protein TANK facilitates cross-talk within the I κ B kinase family during Toll-like receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(41), 17093–17098. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114194108>
 41. Cooper, M. D., & Alder, M. N. (2006). The Evolution of Adaptive Immune Systems. *Cell*, 124(4), 815–822. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.001>
 42. Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S33–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
 43. Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 14(S2), 49. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>
 44. Neurath, A. R. (2008). Immune Response to Viruses: Antibody-Mediated Immunity. In *Encyclopedia of Virology* (pp. 56–70). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00591-4>
 45. Forthal, D. N. (2015). Functions of Antibodies. *Microbiology spectrum*, 2(4), 1. <https://doi.org/10.1128/9781555817411.ch2>
 46. Mix, E., Goertsches, R., & Zett, U. K. (2006). Immunoglobulins—Basic considerations. *Journal of Neurology*, 253(S5), v9–v17. <https://doi.org/10.1007/s00415-006-5002-2>
 47. Senger, K., Hackney, J., Payandeh, J., & Zarrin, A. A. (2015). Antibody Isotype Switching in Vertebrates. In *Results and problems in cell differentiation* (Vol. 57, pp. 295–324). Results Probl Cell Differ. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20819-0_13
 48. Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispens, T. (2014). IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), 520. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>
 49. Polonelli, L., Pontón, J., Elguezabal, N., Moragues, M. D., Casoli, C., Pilotti, E., ... Travassos, L. R. (2008). Antibody complementarity-

- determining regions (CDRs) can display differential antimicrobial, antiviral and antitumor activities. *PLoS ONE*, 3(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002371>
50. Moorhouse, K. G., Nashabeh, W., Deveney, J., Bjork, N. S., Mulkerrin, M. G., & Ryskamp, T. (1997). Validation of an HPLC method for the analysis of the charge heterogeneity of the recombinant monoclonal antibody IDEC-C2B8 after papain digestion. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 16, pp. 593–603). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(97\)00178-7](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(97)00178-7)
 51. Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S41–S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
 52. Ma, H., & O’Kennedy, R. (2015). The Structure of Natural and Recombinant Antibodies. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1348, pp. 7–11). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2999-3_2
 53. Collins, A. M., & Watson, C. T. (2018). Immunoglobulin Light Chain Gene Rearrangements, Receptor Editing and the Development of a Self-Tolerant Antibody Repertoire. *Frontiers in Immunology*, 9(OCT), 2249. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02249>
 54. Fossati, G., Bucknall, R. C., & Edwards, S. W. (2002). Insoluble and soluble immune complexes activate neutrophils by distinct activation mechanisms: changes in functional responses induced by priming with cytokines. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61(1), 13–19. <https://doi.org/10.1136/ARD.61.1.13>
 55. Lux, A., Yu, X., Scanlan, C. N., & Nimmerjahn, F. (2013). Impact of Immune Complex Size and Glycosylation on IgG Binding to Human FcγRs. *The Journal of Immunology*, 190(8), 4315–4323. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200501>
 56. Huot, S., Laflamme, C., Fortin, P. R., Boilard, E., & Pouliot, M. (2020). IgG-aggregates rapidly upregulate FcγRI expression at the surface of human neutrophils in a FcγRII-dependent fashion: A crucial role for FcγRI in the generation of reactive oxygen species. *FASEB Journal*, 34(11), 15208–15221. <https://doi.org/10.1096/fj.202001085R>
 57. Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. v. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 8(1), 34–47. <https://doi.org/10.1038/nri2206>

58. Bournazos, S., Gupta, A., & Ravetch, J. v. (2020, October 11). The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00410-0>
59. Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. v. (2007, January 22). The antiinflammatory activity of IgG: The intravenous IgG paradox. *Journal of Experimental Medicine*. Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1084/jem.20061788>
60. Sondermann, P., Pincetic, A., Maamary, J., Lammens, K., & Ravetch, J. v. (2013). General mechanism for modulating immunoglobulin effector function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(24), 9868–9872. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307864110>
61. Pincetic, A., Bournazos, S., Dilillo, D. J., Maamary, J., Wang, T. T., Dahan, R., ... Ravetch, J. v. (2014, August 21). Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nature Immunology*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1038/ni.2939>
62. Vogelpoel, L. T. C. C., Baeten, D. L. P. P., de Jong, E. C., & den Dunnen, J. (2015). Control of Cytokine Production by Human Fc Gamma Receptors: Implications for Pathogen Defense and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, *6*(FEB), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00079>
63. Getahun, A., & Cambier, J. C. (2015, November 1). Of ITIMs, ITAMs, and ITAMis: Revisiting immunoglobulin Fc receptor signaling. *Immunological Reviews*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1111/imr.12336>
64. Gerber, J. S., & Mosser, D. M. (2001). Stimulatory and inhibitory signals originating from the macrophage Fcγ receptors. *Microbes and Infection*, *3*(2), 131–139. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01360-5](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01360-5)
65. Marois, L., Paré, G., Vaillancourt, M., Rollet-Labelle, E., & Naccache, P. H. (2011). FcγRIIIb Triggers Raft-dependent Calcium Influx in IgG-mediated Responses in Human Neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(5), 3509–3519. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.169516>
66. Tourdot, B. E., Brenner, M. K., Keough, K. C., Holyst, T., Newman, P. J., & Newman, D. K. (2013). Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif (ITIM)-Mediated Inhibitory Signaling Is Regulated by Sequential Phosphorylation Mediated by Distinct Nonreceptor Tyrosine Kinases: A Case Study Involving PECAM-1. *Biochemistry*, *52*(15), 2597–2608. <https://doi.org/10.1021/bi301461t>

67. Parsons, S. J., & Parsons, J. T. (2004). Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*, *23*(48), 7906–7909. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208160>
68. Koretzky, G. A., Abtahian, F., & Silverman, M. A. (2006, January). SLP76 and SLP65: Complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nature Reviews Immunology*. *Nat Rev Immunol*. <https://doi.org/10.1038/nri1750>
69. Mkaddem, S. ben, Murua, A., Flament, H., Titeca-Beauport, D., Bounaix, C., Danelli, L., ... Monteiro, R. C. (2017). Lyn and Fyn function as molecular switches that control immunoreceptors to direct homeostasis or inflammation. *Nature Communications*, *8*(1), 246. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00294-0>
70. ben Mkaddem, S., Benhamou, M., & Monteiro, R. C. (2019). Understanding Fc Receptor Involvement in Inflammatory Diseases: From Mechanisms to New Therapeutic Tools. *Frontiers in Immunology*, *10*(APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00811>
71. Blank, U., Launay, P., Benhamou, M., & Monteiro, R. C. (2009). Inhibitory ITAMs as novel regulators of immunity. *Immunological Reviews*, *232*(1), 59–71. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00832.x>
72. ben Mkaddem, S., Hayem, G., Jönsson, F., Rossato, E., Boedec, E., Boussetta, T., ... Monteiro, R. C. (2014). Shifting FcγRIIA-ITAM from activation to inhibitory configuration ameliorates arthritis. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(9), 3945–3959. <https://doi.org/10.1172/JCI74572>
73. Schnare, M., Barton, G. M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S., & Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nature Immunology*, *2*(10), 947–950. <https://doi.org/10.1038/ni712>
74. Lambert, C., Preijers, F. W. M. B., Yanikkaya Demirel, G., & Sack, U. (2017). Monocytes and macrophages in flow: an ESCCA initiative on advanced analyses of monocyte lineage using flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, *92*(3), 180–188. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21280>
75. Triantafilou, M., Miyake, K., Golenbock, D. T., & Triantafilou, K. (2002). Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *Journal of Cell Science*, *115*(12), 2603–2611. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.12.2603>

76. Pfeiffer, A., Böttcher, A., Orsó, E., Kapinsky, M., Nagy, P., Bodnár, A., ... Schmitz, G. (2001). Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *European Journal of Immunology*, *31*(11), 3153–3164. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200111\)31:11<3153::AID-IMMU3153>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200111)31:11<3153::AID-IMMU3153>3.0.CO;2-0)
77. Triantafilou, M., & Triantafilou, K. (2002). Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends in Immunology*, *23*(6), 301–304. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02233-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02233-0)
78. Shang, L., Daubeuf, B., Triantafilou, M., Olden, R., Dépis, F., Raby, A.-C., ... Elson, G. (2014). Selective Antibody Intervention of Toll-like Receptor 4 Activation through Fc γ Receptor Tethering. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(22), 15309–15318. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.537936>
79. Rittirsch, D., Flierl, M. A., Day, D. E., Nadeau, B. A., Zetoune, F. S., Sarma, J. V., ... Ward, P. A. (2009). Cross-Talk between TLR4 and Fc γ ReceptorIII (CD16) Pathways. *PLoS Pathogens*, *5*(6), e1000464. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000464>
80. Miller, Y. I., Choi, S.-H., Wiesner, P., & Bae, Y. S. (2012). The SYK side of TLR4: signalling mechanisms in response to LPS and minimally oxidized LDL. *British Journal of Pharmacology*, *167*(5), 990–999. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02097.x>
81. Kramer, P. R., Winger, V., & Reuben, J. (2009). PI3K limits TNF- α production in CD16-activated monocytes. *European Journal of Immunology*, *39*(2), 561–570. <https://doi.org/10.1002/eji.200838801>
82. Abrahams, V. M., Cambridge, G., Lydyard, P. M., & Edwards, J. C. W. (2000). Induction of tumor necrosis factor α production by adhered human monocytes: A key role for Fc γ receptor type IIIA in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, *43*(3), 608. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200003\)43:3<608::AID-ANR18>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200003)43:3<608::AID-ANR18>3.0.CO;2-G)
83. Vogelpoel, L. T. C., Baeten, D. L. P., de Jong, E. C., & den Dunnen, J. (2015). Control of Cytokine Production by Human Fc Gamma Receptors: Implications for Pathogen Defense and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, *6*(FEB), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00079>
84. Wei, Z.-M., Wang, Z., Wan, X.-J., Li, X.-J., Li, Y.-X., Bai, Y., ... Liu, Z.-F. (2019). FcR γ deficiency improves survival in experimental sepsis by down-regulating TLR4 signaling pathway. *Immunologic Research*, *67*(1), 77–83. <https://doi.org/10.1007/s12026-018-9039-y>

85. Shalova, I. N., Kajiji, T., Lim, J. Y., Gómez-Piña, V., Fernández-Ruíz, I., Arnalich, F., ... Biswas, S. K. (2012). CD16 Regulates TRIF-Dependent TLR4 Response in Human Monocytes and Their Subsets. *The Journal of Immunology*, 188(8), 3584–3593. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100244>
86. Ziegler-Heitbrock, L. (2007). The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(3), 584–592. <https://doi.org/10.1189/jlb.0806510>
87. Tsujimoto, H., Ono, S., Hiraki, S., Majima, T., Kawarabayashi, N., Sugasawa, H., ... Mochizuki, H. (2004). Hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fibers reduced the number of CD16+ CD14+ monocytes in patients with septic shock. *Journal of Endotoxin Research*, 10(4), 229–237. <https://doi.org/10.1179/096805104225005814>
88. Wenink, M. H., Santegoets, K. C. M., Roelofs, M. F., Huijbens, R., Koenen, H. J. P. M., van Beek, R., ... Radstake, T. R. D. J. (2009). The Inhibitory FcγIIb Receptor Dampens TLR4-Mediated Immune Responses and Is Selectively Up-regulated on Dendritic Cells from Rheumatoid Arthritis Patients with Quiescent Disease. *The Journal of Immunology*, 183(7), 4509–4520. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900153>
89. Bournazos, S., & Ravetch, J. v. (2017). Diversification of IgG effector functions. *International Immunology*, 29(7), 303–310. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx025>
90. Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. v. (2006). Fcγ receptors: Old friends and new family members. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.11.010>
91. Ravetch, J. v, & Bolland, S. (2001). IgG Fc Receptors. *Annual Review of Immunology*, 19, 275–290.
92. Schwab, I., & Nimmerjahn, F. (2013). Intravenous immunoglobulin therapy: How does IgG modulate the immune system? *Nature Reviews Immunology*, 13(3), 176–189. <https://doi.org/10.1038/nri3401>
93. Li, W., Prabakaran, P., Chen, W., Zhu, Z., Feng, Y., & Dimitrov, D. (2016). Antibody Aggregation: Insights from Sequence and Structure. *Antibodies*, 5(3), 19. <https://doi.org/10.3390/antib5030019>
94. Martin, N., Ma, D., Herbet, A., Boquet, D., Winnik, F. M., & Tribet, C. (2014). Prevention of thermally induced aggregation of igg antibodies by noncovalent interaction with poly(acrylate) derivatives. *Biomacromolecules*, 15(8), 2952–2962. <https://doi.org/10.1021/bm5005756>

95. Wang, X.-Y., Wang, B., & Wen, Y.-M. (2019). From therapeutic antibodies to immune complex vaccines. *npj Vaccines*, 4(1), 2. <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0095-z>
96. Tay, M. Z., Wiehe, K., & Pollara, J. (2019). Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis in Antiviral Immune Responses. *Frontiers in Immunology*, 10(FEB), 332. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00332>
97. Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispens, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), 520. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>
98. Chen, H., Maul-Pavicic, A., Holzer, M., Huber, M., Salzer, U., Chevalier, N., ... Kolb, P. (2022). Detection and functional resolution of soluble immune complexes by an FcγR reporter cell panel. *EMBO Molecular Medicine*, 14(1), e14182. <https://doi.org/10.15252/emmm.202114182>
99. Hachulla, E., le Masson, G., Solé, G., Hamidou, M., Desnuelle, C., Azulay, J.-P., ... Puget, S. (2018). Safety of Intravenous Immunoglobulin (Tegeline®), Administered at Home in Patients with Autoimmune Disease: Results of a French Study. *BioMed Research International*, 2018, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/8147251>
100. Chakrabarti, A. (2018). Separation of Monoclonal Antibodies by Analytical Size Exclusion Chromatography. In *Antibody Engineering*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73321>
101. Tankersley, D. L., Preston, M. S., & Finlayson, J. S. (1988). Immunoglobulin G dimer: An idiotype-anti-idiotype complex. *Molecular Immunology*, 25(1), 41–48. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(88\)90088-0](https://doi.org/10.1016/0161-5890(88)90088-0)
102. Szenczi, Á., Kardos, J., Medgyesi, G. A., & Závodszy, P. (2006). The effect of solvent environment on the conformation and stability of human polyclonal IgG in solution. *Biologicals*, 34(1), 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2005.06.007>
103. le Basle, Y., Chennell, P., Tokhadze, N., Astier, A., & Sautou, V. (2020). Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(1), 169–190. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.08.009>
104. Moggridge, J., Biggar, K., Dawson, N., & Storey, K. B. (2017). Sensitive Detection of Immunoglobulin G Stability Using in Real-Time Isothermal Differential Scanning Fluorimetry: Determinants of Protein Stability for Antibody-Based Therapeutics. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 16(6), 997–1005. <https://doi.org/10.1177/1533034617714149>

105. Kuzman, D., Bunc, M., Ravnik, M., Reiter, F., Žagar, L., & Bončina, M. (2021). Long-term stability predictions of therapeutic monoclonal antibodies in solution using Arrhenius-based kinetics. *Scientific Reports*, *11*(1), 20534. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99875-9>
106. Kustiawan, I., Derksen, N. I. L., Guhr, T., Kruithof, S., Jiskoot, W., Vidarsson, G., & Rispens, T. (2018). Dimeric IgG complexes from IVIg are incapable of inducing in vitro neutrophil degranulation or complement activation. *PLOS ONE*, *13*(4), e0195729. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195729>
107. Jungi, T. W., Lerch, P. G., Cachelin, A. B., & Morell, A. (1988). Monomeric and dimeric IgG1 as probes for assessing high-affinity and low-affinity receptors for IgG on human monocyte-derived macrophages and on activated macrophages. *Molecular Immunology*, *25*(8), 719–729. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(88\)90108-3](https://doi.org/10.1016/0161-5890(88)90108-3)
108. Nagelkerke, S. Q., Dekkers, G., Kustiawan, I., van de Bovenkamp, F. S., Geissler, J., Plomp, R., ... Kuijpers, T. W. (2014). Inhibition of FcγR-mediated phagocytosis by IVIg is independent of IgG-Fc sialylation and FcγRIIb in human macrophages. *Blood*, *124*(25), 3709–3718. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-576835>
109. Sabroe, I., Jones, E. C., Usher, L. R., Whyte, M. K. B., & Dower, S. K. (2002). Toll-Like Receptor (TLR)2 and TLR4 in Human Peripheral Blood Granulocytes: A Critical Role for Monocytes in Leukocyte Lipopolysaccharide Responses. *The Journal of Immunology*, *168*(9), 4701–4710. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.9.4701>
110. Thomas, G. D., Hamers, A. A. J., Nakao, C., Marcovecchio, P., Taylor, A. M., McSkimming, C., ... Hedrick, C. C. (2017). Human Blood Monocyte Subsets. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *37*(8), 1548–1558. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309145>
111. Appleby, L. J., Nausch, N., Midzi, N., Mdluza, T., Allen, J. E., & Mutapi, F. (2013). Sources of heterogeneity in human monocyte subsets. *Immunology Letters*, *152*(1), 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.03.004>
112. Barth, E., Fischer, G., Schneider, E. M., Wollmeyer, J., Georgieff, M., & Weiss, M. (2001). DIFFERENCES IN THE EXPRESSION OF CD64 AND mCD14 ON POLYMORPHONUCLEAR CELLS AND ON MONOCYTES IN PATIENTS WITH SEPTIC SHOCK. *Cytokine*, *14*(5), 299–302. <https://doi.org/10.1006/cyto.2001.0880>

113. Clanchy, F. I. L. (2016). High-Affinity Fc Receptor Expression Indicates Relative Immaturity in Human Monocytes. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, *36*(5), 279–290. <https://doi.org/10.1089/jir.2015.0060>
114. Anania, J. C., Chenoweth, A. M., Wines, B. D., & Hogarth, P. M. (2019). The Human FcγRII (CD32) Family of Leukocyte FcR in Health and Disease. *Frontiers in Immunology*, *10*(MAR), 464. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00464>
115. Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., ... Lutz, M. B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, *116*(16), e74–e80. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558>
116. Bosshart, H., & Heinzelmann, M. (2016). THP-1 cells as a model for human monocytes. *Annals of Translational Medicine*, *4*(21), 438–438. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.08.53>
117. Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, *23*(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>
118. Park, E. K., Jung, H. S., Yang, H. I., Yoo, M. C., Kim, C., & Kim, K. S. (2007). Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation Research*, *56*(1), 45–50. <https://doi.org/10.1007/s00011-007-6115-5>
119. Grievink, H. W., Luisman, T., Kluft, C., Moerland, M., & Malone, K. E. (2016). Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. *Biopreservation and Biobanking*, *14*(5), 410–415. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0104>
120. Loken, M. R., Brosnan, J. M., Bach, B. A., & Ault, K. A. (1990). Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. *Cytometry*, *11*(4), 453–459. <https://doi.org/10.1002/cyto.990110402>
121. Bhattacharjee, J., Das, B., Mishra, A., Sahay, P., & Upadhyay, P. (2018). Monocytes isolated by positive and negative magnetic sorting techniques show different molecular characteristics and immunophenotypic behaviour. *F1000Research*, *6*, 2045. <https://doi.org/10.12688/f1000research.12802.3>

122. Gonzalez-Quintela, A., Alende, R., Gude, F., Campos, J., Rey, J., Meijide, L. M., ... Vidal, C. (2007). Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clinical and Experimental Immunology*, *151*(1), 42–50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03545.x>
123. Jazayeri, M. H., Pourfathollah, A. A., Rasaei, M. J., Porpak, Z., & Jafari, M. E. (2013). The concentration of total serum IgG and IgM in sera of healthy individuals varies at different age intervals. *Biomedicine & Aging Pathology*, *3*(4), 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.biomag.2013.09.002>
124. Chaturvedi, S. K., Parupudi, A., Juul-Madsen, K., Nguyen, A., Vorup-Jensen, T., Dragulin-Otto, S., ... Schuck, P. (2020). Measuring aggregates, self-association, and weak interactions in concentrated therapeutic antibody solutions. *mAbs*, *12*(1). <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1810488>
125. Bruhns, P. (2012). Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*, *119*(24), 5640–5649. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-380121>
126. Forest-Nault, C., Gaudreault, J., Henry, O., Durocher, Y., & de Crescenzo, G. (2021). On the Use of Surface Plasmon Resonance Biosensing to Understand IgG-FcγR Interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(12), 6616. <https://doi.org/10.3390/ijms22126616>
127. Aloulou, M., ben Mkaddem, S., Biarnes-Pelicot, M., Boussetta, T., Souchet, H., Rossato, E., ... Monteiro, R. C. (2012). IgG1 and IVIg induce inhibitory ITAM signaling through FcγRIII controlling inflammatory responses. *Blood*, *119*(13), 3084–3096. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-376046>
128. Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. v. (2008). Anti-Inflammatory Actions of Intravenous Immunoglobulin. *Annual Review of Immunology*, *26*(1), 513–533. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090232>
129. Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S., & Dinarello, C. (1990). Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*, *75*(1), 40–47. <https://doi.org/10.1182/blood.V75.1.40.40>
130. Jung, S. H., Park, C. S., Kim, M. H., Kim, E. Y., Chang, H. S., Ki, S. Y., ... Lee, H. B. (1998). Lipopolysaccharide-induced Synthesis of IL-1β, IL-6, TNF-α and TGF-β by Peripheral Blood Mononuclear Cells.

Tuberculosis and Respiratory Diseases, 45(4), 846.
<https://doi.org/10.4046/trd.1998.45.4.846>

131. Estrada-Bernal, A., Mendoza-Milla, C., Ventura-Gallegos, J. L., López-Bojórquez, L. N., Miranda-Peralta, E., Arechavaleta-Velasco, F., ... Zentella-Dehesa, A. (2003). NF- κ B dependent activation of human endothelial cells treated with soluble products derived from human lymphomas. *Cancer Letters*, 191(2), 239–248.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00634-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00634-1)
132. Maeß, M. B., Wittig, B., Cignarella, A., & Lorkowski, S. (2014). Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. *Journal of Immunological Methods*, 402(1–2), 76–81.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.11.006>
133. Zeng, C., Wang, W., Yu, X., Yang, L., Chen, S., & Li, Y. (2015). Pathways related to PMA-differentiated THP1 human monocytic leukemia cells revealed by RNA-Seq. *Science China Life Sciences*, 58(12), 1282–1287.
<https://doi.org/10.1007/s11427-015-4967-4>
134. Oliveira-Nascimento, L., Massari, P., & Wetzler, L. M. (2012). The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Frontiers in Immunology*, 3(APR), 79.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00079>
135. Brandt, K. J., Fickentscher, C., Kruithof, Egbert. K. O., & de Moerloose, P. (2013). TLR2 Ligands Induce NF- κ B Activation from Endosomal Compartments of Human Monocytes. *PLoS ONE*, 8(12), e80743.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080743>
136. Hu, J., Wang, G., Liu, X., Zhou, L., Jiang, M., & Yang, L. (2013). Polo-Like Kinase 1 (PLK1) Is Involved in Toll-like Receptor (TLR)-Mediated TNF- α Production in Monocytic THP-1 Cells. *PLoS ONE*, 8(10), e78832.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078832>
137. DAMAS, P., REUTER, A., GYSEN, P., DEMONTY, J., LAMY, M., & FRANCHIMONT, P. (1989). Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Critical Care Medicine*, 17(10), 975–978. <https://doi.org/10.1097/00003246-198910000-00001>
138. Zhang, Y., Luo, Y., Nijiatijiang, G., Balati, K., Tuerdi, Y., & Liu, L. (2019). Correlations of Changes in Brain Natriuretic Peptide (BNP) and Cardiac Troponin I (cTnI) with Levels of C-Reactive Protein (CRP) and TNF- α in Pediatric Patients with Sepsis. *Medical Science Monitor*, 25, 2561–2566.
<https://doi.org/10.12659/MSM.912318>

139. Eidt, M. v., Nunes, F. B., Pedrazza, L., Caeran, G., Pellegrin, G., Melo, D. A. S., ... Oliveira, J. R. (2016). Biochemical and inflammatory aspects in patients with severe sepsis and septic shock: The predictive role of IL-18 in mortality. *Clinica Chimica Acta*, *453*, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.12.009>
140. Georgescu, A. M., Banescu, C., Azamfirei, R., Hutanu, A., Moldovan, V., Badea, I., ... Azamfirei, L. (2020). Evaluation of TNF- α genetic polymorphisms as predictors for sepsis susceptibility and progression. *BMC Infectious Diseases*, *20*(1), 221. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4910-6>
141. Takeuchi, T., Miyasaka, N., Tatsuki, Y., Yano, T., Yoshinari, T., Abe, T., & Koike, T. (2011). Baseline tumour necrosis factor alpha levels predict the necessity for dose escalation of infliximab therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *70*(7), 1208–1215. <https://doi.org/10.1136/ard.2011.153023>
142. Fresegna, D., Bullitta, S., Musella, A., Rizzo, F. R., de Vito, F., Guadalupi, L., ... Gentile, A. (2020). Re-Examining the Role of TNF in MS Pathogenesis and Therapy. *Cells*, *9*(10), 2290. <https://doi.org/10.3390/cells9102290>
143. Luo, Y., He, H., Zhang, M., Huang, X., & Fan, N. (2016). Altered serum levels of TNF- α , IL-6 and IL-18 in manic, depressive, mixed state of bipolar disorder patients. *Psychiatry Research*, *244*, 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2016.07.027>
144. van Mirre, E., Teeling, J. L., van der Meer, J. W. M., Bleeker, W. K., & Hack, C. E. (2004). Monomeric IgG in Intravenous Ig Preparations Is a Functional Antagonist of Fc γ RII and Fc γ RIIIb. *The Journal of Immunology*, *173*(1), 332–339. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.1.332>
145. Buscher, K., Ehinger, E., Gupta, P., Pramod, A. B., Wolf, D., Tweet, G., ... Ley, K. (2017). Natural variation of macrophage activation as disease-relevant phenotype predictive of inflammation and cancer survival. *Nature Communications*, *8*(1), 16041. <https://doi.org/10.1038/ncomms16041>
146. Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, *23*(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>
147. Aldo, P. B., Craveiro, V., Guller, S., & Mor, G. (2013). Effect of Culture Conditions on the Phenotype of THP-1 Monocyte Cell Line. *American*

Journal of Reproductive Immunology, 70(1), 80–86.
<https://doi.org/10.1111/aji.12129>

148. MacKenzie, S. (2003). LPS-stimulated expression of a tumor necrosis factor-alpha mRNA in primary trout monocytes and in vitro differentiated macrophages. *Developmental & Comparative Immunology*, 27(5), 393–400. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(02\)00135-0](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(02)00135-0)
149. Kalb, D., Vo, H. D., Adikari, S., Hong-Geller, E., Munsky, B., & Werner, J. (2021). Visualization and modeling of inhibition of IL-1 β and TNF- α mRNA transcription at the single-cell level. *Scientific Reports*, 11(1), 13692. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92846-0>
150. Dean, J. L. E., Wait, R., Mahtani, K. R., Sully, G., Clark, A. R., & Saklatvala, J. (2001). The 3' Untranslated Region of Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA Is a Target of the mRNA-Stabilizing Factor HuR. *Molecular and Cellular Biology*, 21(3), 721–730. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.3.721-730.2001>
151. Kishore, R., McMullen, M. R., & Nagy, L. E. (2001). Stabilization of Tumor Necrosis Factor α mRNA by Chronic Ethanol. *Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 41930–41937. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107181200>
152. Falvo, J. v., Tsytsykova, A. v., & Goldfeld, A. E. (2010). Transcriptional control of the TNF Gene. *Current Directions in Autoimmunity*, 11, 27–60. <https://doi.org/10.1159/000289196>
153. Sung, M.-H., Li, N., Lao, Q., Gottschalk, R. A., Hager, G. L., & Fraser, I. D. C. (2014). Switching of the Relative Dominance Between Feedback Mechanisms in Lipopolysaccharide-Induced NF- κ B Signaling. *Science Signaling*, 7(308). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004764>
154. Zambrano, S., Bianchi, M. E., & Agresti, A. (2014). High-Throughput Analysis of NF- κ B Dynamics in Single Cells Reveals Basal Nuclear Localization of NF- κ B and Spontaneous Activation of Oscillations. *PLoS ONE*, 9(3), e90104. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090104>
155. Yang, F., Tang, E., Guan, K., & Wang, C.-Y. (2003). IKK β Plays an Essential Role in the Phosphorylation of RelA/p65 on Serine 536 Induced by Lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 170(11), 5630–5635. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.11.5630>
156. Pradère, J.-P., Hernandez, C., Koppe, C., Friedman, R. A., Luedde, T., & Schwabe, R. F. (2016). Negative regulation of NF- κ B p65 activity by serine 536 phosphorylation. *Science Signaling*, 9(442). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aab2820>

157. Bonizzi, G., & Karin, M. (2004). The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology*, *25*(6), 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.03.008>
158. Sakurai, H., Suzuki, S., Kawasaki, N., Nakano, H., Okazaki, T., Chino, A., ... Saiki, I. (2003). Tumor Necrosis Factor- α -induced IKK Phosphorylation of NF- κ B p65 on Serine 536 Is Mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(38), 36916–36923. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301598200>
159. Dorrington, M. G., & Fraser, I. D. C. (2019). NF- κ B Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. *Frontiers in Immunology*, *10*(APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00705>
160. Hoffmann, A., Natoli, G., & Ghosh, G. (2006). Transcriptional regulation via the NF- κ B signaling module. *Oncogene*, *25*(51), 6706–6716. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209933>
161. Werner, S. L., Barken, D., & Hoffmann, A. (2005). Stimulus Specificity of Gene Expression Programs Determined by Temporal Control of IKK Activity. *Science*, *309*(5742), 1857–1861. <https://doi.org/10.1126/science.1113319>
162. Sharif, O., Bolshakov, V. N., Raines, S., Newham, P., & Perkins, N. D. (2007). Transcriptional profiling of the LPS induced NF- κ B response in macrophages. *BMC Immunology*, *8*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-8-1>
163. Dunne, A., Carpenter, S., Brikos, C., Gray, P., Strelow, A., Wesche, H., ... O'Neill, L. A. J. (2010). IRAK1 and IRAK4 Promote Phosphorylation, Ubiquitination, and Degradation of MyD88 Adaptor-like (Mal). *Journal of Biological Chemistry*, *285*(24), 18276–18282. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.098137>
164. Powers, J. P., Li, S., Jaen, J. C., Liu, J., Walker, N. P. C., Wang, Z., & Wesche, H. (2006). Discovery and initial SAR of inhibitors of interleukin-1 receptor-associated kinase-4. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *16*(11), 2842–2845. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.03.020>
165. Mócsai, A., Ruland, J., & Tybulewicz, V. L. J. (2010). The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nature Reviews Immunology*, *10*(6), 387–402. <https://doi.org/10.1038/nri2765>
166. Ghazizadeh, S., Bolen, J. B., & Fleit, H. B. (1995). Tyrosine phosphorylation and association of Syk with Fc γ RII in monocytic THP-1

- cells. *Biochemical Journal*, 305(2), 669–674.
<https://doi.org/10.1042/bj3050669>
167. Park, J. G., Son, Y.-J., Yoo, B. C., Yang, W. S., Kim, J. H., Kim, J.-H., & Cho, J. Y. (2017). Syk Plays a Critical Role in the Expression and Activation of IRAK1 in LPS-Treated Macrophages. *Mediators of Inflammation*, 2017, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/1506248>
168. Chaudhary, A., Fresquez, T. M., & Naranjo, M. J. (2007). Tyrosine kinase Syk associates with toll-like receptor 4 and regulates signaling in human monocytic cells. *Immunology & Cell Biology*, 85(3), 249–256. <https://doi.org/10.1038/sj.icb7100030>
169. Ulanova, M., Asfaha, S., Stenton, G., Lint, A., Gilbertson, D., Schreiber, A., & Befus, D. (2007). Involvement of Syk protein tyrosine kinase in LPS-induced responses in macrophages. *Journal of Endotoxin Research*, 13(2), 117–125. <https://doi.org/10.1177/0968051907079125>
170. Lin, Y.-C., Huang, D.-Y., Chu, C.-L., & Lin, W.-W. (2010). Anti-inflammatory actions of Syk inhibitors in macrophages involve non-specific inhibition of toll-like receptors-mediated JNK signaling pathway. *Molecular Immunology*, 47(7–8), 1569–1578. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.01.008>
171. Rao, S., Liu, X., Freedman, B. D., & Behrens, E. M. (2013). Spleen Tyrosine Kinase (Syk)-dependent Calcium Signals Mediate Efficient CpG-induced Exocytosis of Tumor Necrosis Factor α (TNF α) in Innate Immune Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(18), 12448–12458. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.454405>
172. Lee, J. Y., Ye, J., Gao, Z., Youn, H. S., Lee, W. H., Zhao, L., ... Hwang, D. H. (2003). Reciprocal Modulation of Toll-like Receptor-4 Signaling Pathways Involving MyD88 and Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT by Saturated and Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37041–37051. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305213200>
173. Guha, M., & Mackman, N. (2002). The Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway Limits Lipopolysaccharide Activation of Signaling Pathways and Expression of Inflammatory Mediators in Human Monocytic Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 32124–32132. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203298200>
174. Hart, J. R., & Vogt, P. K. (2011). Phosphorylation of AKT: a Mutational Analysis. *Oncotarget*, 2(6), 467–476. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.293>

175. Luyendyk, J. P., Schabbauer, G. A., Tencati, M., Holscher, T., Pawlinski, R., & Mackman, N. (2008). Genetic Analysis of the Role of the PI3K-Akt Pathway in Lipopolysaccharide-Induced Cytokine and Tissue Factor Gene Expression in Monocytes/Macrophages. *The Journal of Immunology*, *180*(6), 4218–4226. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.4218>
176. Mancardi, D. A., Albanesi, M., Jönsson, F., Iannascoli, B., van Rooijen, N., Kang, X., ... Bruhns, P. (2013). The high-affinity human IgG receptor FcγRI (CD64) promotes IgG-mediated inflammation, anaphylaxis, and antitumor immunotherapy. *Blood*, *121*(9), 1563–1573. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-442541>
177. Shah, D. K., & Betts, A. M. (2013). Antibody biodistribution coefficients: Inferring tissue concentrations of monoclonal antibodies based on the plasma concentrations in several preclinical species and human. *mAbs*, *5*(2), 297–305. <https://doi.org/10.4161/mabs.23684>
178. Ginhoux, F., & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology* *2014 14:6*, *14*(6), 392–404. <https://doi.org/10.1038/nri3671>

11. Publicación principal

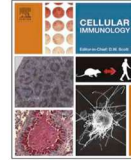
Cellular Immunology 355 (2020) 104146



Contents lists available at ScienceDirect

Cellular Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ycimm



THP-1 cells increase TNF- α production upon LPS + soluble human IgG co-stimulation supporting evidence for TLR4 and Fc γ receptors crosstalk



Omar Vargas-Hernández^a, José Luis Ventura-Gallegos^a, María Laura Ventura-Ayala^b, Martha Torres^c, Alejandro Zentella^{a,b,1}, Sigifredo Pedraza-Sánchez^{b,*,1}

^a Departamento de Medicina Genómica y Toxicología ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico

^b Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Mexico

^c Departamento de Investigación en Microbiología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER), Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Human
Toll-like receptors
Fc gamma receptors
Crosstalk
Lipopolysaccharide
Monocyte - macrophage

ABSTRACT

The lipopolysaccharide (LPS) of Gram-negative bacteria is recognized on human monocytes and macrophages by TLR4 and MD2 and induces the production of inflammatory cytokines; the LPS + IgG complexes co-stimulation increases the cytokine production, mediated by the Fc- γ RIIa (CD32a). We stimulated human CD14 + monocytes or THP-1 cells with LPS or LPS + soluble human IgG (sIgG) and TNF- α transcription and production, assessed RT-qPCR, ELISA, or flow cytometry, was enhanced by 30% upon LPS + sIgG compared to LPS stimulation. LPS + sIgG co-stimulation affected the NF- κ B pathway (p65 phosphorylation and nucleus translocation, and I κ B- α degradation). The biochemical inhibition of IRAK 1/4 and Syk kinases suppressed the enhancer effect of LPS + sIgG on TNF- α production, suggesting the involvement of both MyD88 dependent and independent pathways. Our results suggest that during LPS activation, sIgG may participate in a TLR4 - Fc- γ R crosstalk.

12. Anexo: Primer proyecto y otras publicaciones

“Estudio funcional de CDK2 modificada”

Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. Departamento de Bioquímica “Dr. Guillermo Soberón Acevedo”.

Tutores: Dr. Alejandro Zentella Dehesa, Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos y Dr. Armando Gómez Puyou (QEPD).

Resumen

El control del ciclo celular es uno de los factores alterados en la proliferación masiva de las células cancerosas. Por esto se busca saber más acerca de qué es lo que sucede de manera normal y cuáles son las alteraciones en el cáncer. La transición G1/S del ciclo celular es regulada en parte por el complejo CDK2-Ciclina E. Esta transición es un punto de restricción que determina la progresión del ciclo celular; y de ahí la importancia de conocer sustratos específicos de CDK2. Para encontrar estos sustratos se realizarán ensayos de actividad de cinasa en diferentes extractos de líneas celulares. La CDK2 que se ocupará en el ensayo será una en la cual, la fenilalanina de la posición 80 está reemplazada por una glicina (CDK2 F80G). Esta mutación no altera su unión al sustrato, sólo su unión a ATP, por lo cual se utilizará un ortólogo del mismo (N6-bencil-ATP), que sí es unido por la mutante y que le permite recuperar su actividad de cinasa. El vector de CDK2 F80G se clona, se transfecta, en células empaquetadoras de virus (Sistema Retromax™), y por infección de estas partículas retrovirales se expresa en células STO; de las cuáles se inmunoprecipita el complejo CDK2 F80G–Ciclina E y esto, junto con el N6-bencil-ATP se utilizará en los ensayos de actividad de cinasa en los extractos celulares de interés (líneas celulares: L929, STO, MEF^{-/-CDK2}, MEF, MCF7, ZR). Finalmente, se utilizará la solución de reacción, post-ensayo de actividad de cinasa, para hacer geles bidimensionales e identificar sustratos de CDK2 y determinar las diferencias entre los patrones observados entre las distintas líneas celulares.

Publicaciones primer proyecto

European Journal of Medicinal Chemistry 45 (2010) 379–386



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>



Short communication

Synthesis and cytotoxic activity of 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine- and quinoline-substituted 2-aminopyrimidine derivatives

Miguel Angel Vilchis-Reyes^{a,*}, Alejandro Zentella^b, Miguel Angel Martínez-Urbina^a, Ángel Guzmán^a, Omar Vargas^b, María Teresa Ramírez Apan^a, José Luis Ventura Gallegos^b, Eduardo Díaz^{a,*}

^aInstituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04510, D. F., México

^bInstituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04510, D. F., México

European Journal of Medicinal Chemistry 45 (2010) 1211–1219



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>



Short communication

6-Substituted 2-(N-trifluoroacetyl-amino)imidazopyridines induce cell cycle arrest and apoptosis in SK-LU-1 human cancer cell line

Miguel Angel Martínez-Urbina^{a,*}, Alejandro Zentella^b, Miguel Angel Vilchis-Reyes^a, Ángel Guzmán^a, Omar Vargas^b, María Teresa Ramírez Apan^a, José Luis Ventura Gallegos^b, Eduardo Díaz^{a,*}

^aInstituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04510, D. F., México

^bInstituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04510, D. F., México

**Molecular Events Towards Wnt Pathway
Activation in Cervical Cancer: Changing the
Balance on NKD/DVL Signals**

Carlos Pérez-Plasencia^{1,2,3}, Patricia Piña-Sánchez⁴, Felipe Vaca-Paniagua^{1,2},
Verónica Fragoso-Ontiveros^{1,2}, Nadia Jacobo-Herrera⁵,
César López-Camarillo⁶ and Omar Vargas-Hernández^{1,2}

¹Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, FES-Iztacala,
UBIMED Tlalnepantla, Estado de México

²Instituto Nacional de Cancerología, Laboratorio de Genómica

³Instituto Nacional de Cancerología, Unidad de Genómica y Secuenciación
Masiva (UGESEM-INCan). Tlalpan, D. F.

⁴Instituto Mexicano del Seguro Social, CMNSXXI, UIMEO. Cuauhtemoc, D. F.

⁵INCMNSZ, Unidad de Bioquímica. Tlalpan, D. F.

⁶UACM, Posgrado en Ciencias Genómicas. Benito Juárez, D. F.
México

*Molecular Events Towards Wnt Pathway Activation in Cervical Cancer: Changing the Balance on NKD/DVL Signals. Carlos Pérez-Plasencia, Patricia Piña-Sánchez, Felipe Vaca-Paniagua, Verónica Fragoso-Ontiveros, Nadia Jacobo-Herrera, César López-Camarillo, **Omar Vargas-Hernández**. Capítulo 13 en el libro “Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - Research aspects”. InTech. Editado por Dr. Davy Vanden Broeck. 2012. ISBN 978-953-307-855-7.*