



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

Señalización “inside-out” de CD13 a CR3

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LAURA DÍAZ ALVAREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX. abril 2024.



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.



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

Señalización “inside-out” de CD13 a CR3

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LAURA DÍAZ ALVAREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX. abril 2024

**COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
OFICIO: CGEP/CPCB/IIBM/0221/2024
ASUNTO: Oficio de Jurado**

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **15 de enero de 2024** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **DÍAZ ALVAREZ LAURA** con número de cuenta **302861518** con la tesis titulada **“Señalización inside-out de CD13 a CR3”**, realizada bajo la dirección del **DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidenta: DRA. YVONNE JANE ROSENSTEIN AZOULAY
Vocal: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
Vocal: DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA
Vocal: DRA. CLAUDIA GONZÁLEZ ESPINOSA
Secretaría: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 04 de marzo de 2024

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO



c. c. p. Expediente del alumno

ACBB/JMB/EARR/jmb

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- 1) Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM
- 2) Beca 399345 otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT)

Apoyos a los Estudios de Posgrado (PAEP) 2015

- 3) Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Enrique Ortega, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Para su desarrollo, se contó con financiamiento de DGAPA-UNAM (Proyecto PAPIIT IN208320), y CONAHCYT (Proyecto CB-252428)
- 4) A mi tutor principal, el Dr. Enrique Ortega Soto y los miembros del comité tutor: Dra. Laila Gutiérrez Kobeh y Dra. Maria Isabel Soto Cruz.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

- Mamá, gracias por toda tu paciencia, por la comida deliciosa, por el apoyo económico, por consentirme, por apoyarme para lograr mis objetivos
- Al resto de la familia: papá, Edgar y Edgar Adrián. Por los distintos tipos de apoyo.
- Dr. Enrique Ortega, le agradezco el apoyo constante a mi desarrollo profesional y académico, incluso cuando ha implicado hacer uso de sus recursos personales. Lo aprecio mucho.
- Comité tutor, Dras. Laila Gutiérrez e Isabel Soto les agradezco infinitamente su apoyo durante todo el tiempo que estuve en el doctorado, de verdad fueron un pilar para mí y me encantó trabajar con ustedes.
- Jaime Madrid, auxiliar del Posgrado en Ciencias Biológicas, gracias por abogar siempre por mí, por mantenerme al día con la información relevante para lograr mi grado. Si mi paso por la burocracia del programa no fue más traumático fue gracias a tu excelente trabajo y al extra que siempre ponías para que todo fuera más leve.
- Dr. Eleanor Gray, thank you so much for continuing to be part of my life, for your advice and comments (which are always on point), for recommending me for jobs, and for always having encouraging words for me. You are a fantastic scientist and a wonderful person.
- Colaboradoras y amigas: Clau Gray, Gina López, Mariana Esther Sánchez y Yalbi Balderas, gracias por confiar en mí y en que mis conocimientos y habilidades pudieran enriquecer sus trabajos, todas son excelentes científicas y seres humanos, estoy muy feliz de que hayamos cruzado caminos. Son un sol en los caminos frecuentemente oscuros de la academia. Espero poder seguir trabajando de cerca con ustedes.
- Miembros presentes y pasados del laboratorio: Montse, Juan Carlos, Andrea y Katy, gracias por sus comentarios y consejos para mejorar mi trabajo, y por los buenos ratos entre experimentos
- Miembros del LFQIP de la Facultad de Medicina de la UNAM, especialmente al Dr. Ismael Bustos
- Carlos Castellanos y Mauricio Ortiz, gracias por la asesoría en la Unidad de Citometría y por siempre recibirme con una sonrisa
- Amigas y amigos: Dannia Colín, Giselle Bello, Nadia Neri, Mario Rivas, Abraham López, Luis Yañez, Víctor Acuña, Bárbara Acuña, Karla Zepeda, Dana Díaz, Jenny Razo, Tania Robles, Tessy Muñoz, Rodolfo García, y Julio Quintana. Gracias porque cada una(o) de ustedes me acompañó en distintos momentos de mi doctorado, me apoyaron a su manera y con sus recursos, y creyeron en mí incluso cuando ni yo podía hacerlo. Son personas inmensamente valiosas para mí y me han dado más de lo que se imaginan.
- Miembros de Cienciorama, La Pandemia de la Desinformación y Científicas Mexicanas. Especialmente a Alicia García Bergua, Guadalupe Zamarrón, Paty Rodil, Quetzally Medina y Cindel Vargas. Gracias por apoyar mi trabajo de comunicación de la ciencia. Fue por ustedes que descubrí la divulgación como un camino profesional que me ha llenado de satisfacción y del cual ya no quiero apartarme. Gracias por regalarme una vocación.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a las siguientes personas:

A mi mamá, **María de Jesús Alvarez González**, quien ha tratado de darme lo mejor en todos sentidos y de mantener una mente abierta ante mis elecciones personales y profesionales, cosa que no siempre ha sido fácil. Saber que tengo en ella a alguien de confianza, dispuesta a escucharme y que me ama y a quien amo incondicionalmente es invaluable para mi salud mental. Espero que la obtención de mi grado te haga feliz y te sientas un poco más tranquila con respecto a mi futuro.

A mi amigo y mentor, el **Dr. Heliodoro Celis Sandoval**, a quien la pandemia nos arrebató el 10 de enero de 2021. Todavía se me hace un nudo en la garganta cuando pienso en que nunca más volveremos a comer un corte de carne, a beber un buen vino y a platicar de todos los chismes que se nos vengan a la mente, en que no volverá a contestar mis mensajes con emojis de gatos y en que no volveremos a sentarnos en el palomar para apoyar a los Pumas. Sin embargo, además de los maravillosos recuerdos, me quedan todas las enseñanzas profesionales y personales que me dejaron los años de convivencia con el Dr. y me toca compartirlas con quien corresponda: alumnas, compañeros, lectoras, etc. Que su legado viva a través de mí y de todas las personas que tuvimos el privilegio de pasar por su laboratorio.

ÍNDICE

Resumen en español	1
Resumen en inglés (Abstract)	2
1. Introducción	
1.1 Receptor 3 de complemento (CR3)	3
1.2 Aminopeptidasa N (CD13)	4
2. Hipótesis	8
3. Objetivos	
3.1 Objetivo general	9
3.2 Objetivos particulares	9
4. Antecedentes	10
5. Metodología	
5.1 Reactivos y anticuerpos	11
5.2 Cultivo celular	12
5.3 Activación de CD11b	12
5.4 Citometría de flujo	13
5.5 Cuantificación de citocinas	13
5.6 Ensamblaje de red teórica de señalización celular	14
5.7 Análisis estadístico	14
6. Resultados	
6.1 El entrecruzamiento de CD13 da como resultado la activación de CR3 (CD11b/CD18)	16
6.2 Syk, Src, PLC γ y la polimerización de actina participan en la activación de CR3 desencadenada por el entrecruzamiento de CD13	19
6.3 El entrecruzamiento de CD13 también controla la expresión de membrana de CR3	22
6.4 Src, PLC γ , Syk y la polimerización de actina también desempeñan un papel en la expresión de membrana de CR3	24
6.5 La activación de CR3 desencadenada por el entrecruzamiento de CD13 se acompaña de la secreción de citocinas inflamatorias	26
6.6 La red de interacciones de proteínas asociadas más cercanamente de manera funcional a CD13, Syk y CR3 (CD11b/CD18) se compone de 76 proteínas	28
6.7 Modelo del mecanismo secuencial de la vía de señalización "inside-out" de CD13 a CR3	32
7. Discusión	35
8. Perspectivas	41
8. Conclusiones	42
9. Referencias bibliográficas	43

10. Anexos

I. Tabla A. Descripción de las 76 proteínas que conforman la red de	49
II. Artículo requisito	67

FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. El entrecruzamiento de CD13 activa a CR3 en macrófagos THP-1	17
Figura 2. El entrecruzamiento de CD13 activa a CR3 en MDMs	18
Figura 3. La inhibición de Src, PLC γ y la polimerización de actina reduce la activación de CR3 (CD11b/CD18) desencadenada por el entrecruzamiento de CD13. La inhibición de Syk la potencia	20
Figura 4. La inhibición de Syk potencia la activación de CR3 (CD11b/CD18) desencadenada por el entrecruzamiento de CD13 en los MDMs	21
Figura 5. El entrecruzamiento de CD13 promueve la expresión de membrana de CR3 en macrófagos THP-1	23
Figura 6. Aumento en la expresión de CD11b después de la diferenciación de monocitos THP-1 en macrófagos	24
Figura 7. La inhibición de Src, PLC γ y la polimerización de actina reduce la expresión de membrana de CR3 desencadenada por el entrecruzamiento de CD13. La inhibición de Syk la potencia	25
Figura 8. La proporción de CD11b activado con respecto a su expresión total en la membrana cambia con los inhibidores de PLC γ y Src, pero no con los de Syk o la polimerización de actina	26
Figura 9. La activación de CR3 desencadenada por el entrecruzamiento de CD13 se acompaña de la secreción de citocinas proinflamatorias	27
Figura 10. Ontología molecular de las proteínas seleccionadas mediante bases de datos informáticas	29
Figura 11. El análisis de bases de datos bioinformáticos con CD13, Syk y CR3 (CD11b/CD18) arrojó 64 moléculas de interés no redundantes	31
Figura 12. La red de interacción de proteínas de interés asociadas con CD13, Syk y CR3 contiene 76 nodos	32
Figura 13. Modelo del mecanismo secuencial de la vía de señalización "inside-out" de CD13 a CR3	34

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
CD13	Cluster de diferenciación 13 (otros nombres: Aminopeptidasa N, APN)
CR3	Receptor 3 de Complemento (otros nombres: Mac-1, CD11b/CD18, integrina $\alpha M/\beta 2$, ITGAM/ITGB2)
Cyt D	Citocalasina D
ECM	Matriz extracelular
FAK	Cinasa de adhesión focal
FBS	Suero fetal bovino
Fc γ Rs	Receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas G
G α M	Anticuerpos de cabra anti-Inmunoglobulina de ratón
GEF	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina
ITAM	Motivo de activación de <u>inmunorreceptor</u> basado en tirosina
mAb	Anticuerpo monoclonal
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
MDM	Macrófago derivado de monocito
MIF	Mediana de intensidad de fluorescencia
iMIF	Mediana de intensidad de fluorescencia integrada
MMP	Metaloproteasa de matriz extracelular
PBMCs	Células mononucleadas de sangre periférica
PFA	Paraformaldehído
PLC γ	Fosfolipasa C gamma
R α M	Anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón
Rh	Recombinante humano
RT	Temperatura ambiente
Src	Estrictamente "sarcoma" en el contexto de moléculas de señalización: Tirosina cinasa del sarcoma de Rous
SKI-1	Inhibidor 1 de Src

Syk

Tirosina cinasa esplénica

RESUMEN

La integrina $\beta 2$ CD11b/CD18, también conocida como receptor 3 de complemento (CR3) y la proteína multifuncional aminopeptidasa N (CD13) son dos receptores de células mieloides con actividades similares: adhesión, migración, fagocitosis de partículas opsonizadas e inducción de estallido respiratorio. Dadas sus funciones en común, localización subcelular compartida, y el hecho de que algunos receptores pueden activar a ciertas integrinas, hipotetizamos que CD13 podría inducir la activación de CR3 por medio de un mecanismo de señalización de adentro hacia afuera (de aquí en adelante “inside-out”) y, al mismo tiempo, tener una influencia sobre su expresión de membrana. Luego de nuestra investigación, encontramos que entrecruzar a las moléculas de CD13 en la superficie de macrófagos humanos no sólo activa a CR3, sino que efectivamente influye sobre su expresión de membrana. Ambos fenómenos se ven afectados por inhibidores de las enzimas Src, PLC γ , Syk y de la polimerización de actina. Además, después de una incubación corta (10 minutos) a 37°C, las células con CD13 entrecruzado comienzan a secretar interferones tipo 1 y 2, IL-12p70 e IL-17. Integramos esta información con un análisis bioinformático para confirmar la conexión entre CD13 y CR3, y sugerir la cascada de señalización que los vincula. Nuestros hallazgos expanden la lista de actividades realizadas por CD13, añadiendo la activación de un receptor diferente (en este caso, CR3) por medio de una cascada de señalización tipo “inside-out”. Esto abre la posibilidad de estudiar la contribución conjunta de CD13 y CR3 en contextos donde se conozca la participación de cualquiera de los dos receptores, tal como la progresión de algunas leucemias como la linfoblástica aguda, en el caso de CD13, o la linfocítica crónica, en el caso de CR3.

ABSTRACT

The β 2 integrin CD11b/CD18, also known as complement receptor 3 (CR3), and the moonlighting protein aminopeptidase N (CD13), are two myeloid immune receptors with overlapping activities: adhesion, migration, phagocytosis of opsonized particles, and respiratory burst induction. Given their common functions, shared physical location, and the fact that some receptors can activate a selection of integrins, we hypothesized that CD13 could induce CR3 activation through an inside-out signaling mechanism, and possibly have an influence on its membrane expression. We revealed that crosslinking CD13 on the surface of human macrophages not only activates CR3 but also influences its membrane expression. Both phenomena are affected by inhibitors of Src, $\text{Plc}\gamma$, Syk, and actin polymerization. Additionally, after only 10 minutes at 37°C, cells with crosslinked CD13 start secreting IFNs type 1 and 2, IL-12p70, and IL-17a. We integrated our data with a bioinformatic analysis to confirm the connection between these receptors, and to suggest the signaling cascade linking them. Our findings expand the list of features of CD13 by adding the activation of a different receptor via inside-out signaling. This opens the possibility of studying the joint contribution of CD13 and CR3 in contexts where either receptor has a recognized role, such as the progression of some leukemias, like the acute lymphoblastic, in the case of CD13, and the chronic lymphocytic, in the case of CR3.

1. INTRODUCCIÓN

CD13 es un receptor fagocítico y de adhesión no clásico, además de una proteína multifuncional que ha sido estudiada extensamente por nuestro grupo. Los receptores de membrana, como CD13, no operan como entidades aisladas en las células del sistema inmunitario, estos son parte de un conjunto de moléculas y eventos de señalización intracelular que dan lugar a las funciones celulares. Por ejemplo, para la extravasación de los leucocitos polimorfonucleados se requiere que las células que circulan en el torrente sanguíneo se frenen y se adhieran al endotelio vascular, inicialmente “rodando” sobre éste y luego adhiriéndose firmemente a las células endoteliales, para finalmente migrar a través de la capa de células endoteliales que recubren la pared interna del vaso sanguíneo. En los procesos de frenado y rodamiento intervienen una serie de integrinas tales como LFA-1, CR3 y VLA-4 que interactúan con sus ligandos en la superficie de las células endoteliales¹. Dado que: 1) este tipo de proteínas pueden pasar de un estado de baja afinidad a uno de alta afinidad por su ligando como consecuencia de la activación de otros receptores, gracias a un mecanismo de señalización de adentro hacia afuera, también llamado “inside-out”, 2) existen reportes de que CD13 es capaz de activar a otras integrinas mediante señalización “inside-out”² y 3) CD13 y CR3 median funciones en común (fagocitosis, adhesión y estallido respiratorio), se decidió explorar la posibilidad de que existiese una comunicación intracelular entre ambos receptores en macrófagos derivados de monocitos humanos (MDMs), utilizando un análisis híbrido con datos bioinformáticos y experimentales.

1.1 Receptor 3 del complemento (CR3)

CR3 forma parte de un grupo de receptores llamados integrinas α/β . Las integrinas α/β son moléculas heterodiméricas de superficie involucradas en la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular (ECM), estallido respiratorio y fagocitosis. En mamíferos existen 18 genes que codifican las cadenas α y 8 que codifican las cadenas β , a nivel de proteína hay 24 integrinas α/β reportadas en vertebrados³. Los heterodímeros en los cuales CD18 es la cadena β se conocen como integrinas $\beta 2$. Se trata de un grupo de cuatro moléculas expresadas en leucocitos, donde la cadena variable α puede ser αL , αM , αX o αD , igualmente llamadas CD11a, b, c, o d, respectivamente. CR3 corresponde a la combinación CD11b/CD18 y esta integrina es conocida también como Mac-1, integrina $\alpha M/\beta 2$ e ITGAM/ITGB2. La subunidad CD11b tiene una masa molecular de 155-165 kDa, mientras que CD18 es un polipéptido de 94 kDa^{4,5}.

Se han descrito dos papeles fisiológicos principales para CR3: el primero es como receptor fagocítico de partículas y patógenos opsonizados con fragmentos iC3b del complemento, dichas presas fagocíticas son internalizadas y destruidas por los fagocitos (revisado en Erdei et al., 2019)⁶. El

segundo papel es como molécula de adhesión, CR3 participa en el rodamiento y extravasación de leucocitos durante la inflamación. Esto se debe a su habilidad de unirse a ligandos presentes en las células endoteliales tales como ICAM-1, ICAM-2, JAM-A, JAM-C y RAGE⁷.

Las integrinas pueden adoptar una de tres posibles conformaciones: abierta, cerrada e intermedia. Dichas conformaciones están relacionadas de manera causal con la afinidad del receptor por sus ligandos, es decir, corresponden a afinidades alta, baja e intermedia, respectivamente. Los ligandos más notables y de mayor tamaño tales como el fibrinógeno, colágeno y fibronectina sólo pueden unirse a las integrinas en la conformación abierta, por lo tanto, éste se puede considerar el estado plenamente activado del receptor. Sin embargo, ligandos más pequeños y péptidos Arg-Asp-Gly son capaces de interactuar con el receptor cerrado, aunque con una menor afinidad que con el receptor abierto. El estado de afinidad intermedia se puede considerar como un estado inactivado adicional en términos de exposición del sitio de unión a ligandos (revisado en Hynes, 2002 y Lefort et al., 2009)^{8,9}.

La activación de CR3, es decir, la transición de la conformación de baja afinidad a la de alta afinidad, ocurre como consecuencia de la interacción del receptor con los ligandos (señalización “outside-in”) o por medio de una señal intracelular proveniente de un receptor de superficie membranal diferente (señalización “inside-out”). Los eventos desencadenados por cualquiera de estas vías de señalización reclutan generalmente efectores distintos, por ejemplo, luego del reconocimiento de la mindina por CR3, la señalización “outside-in” activa en el interior de la célula la vía de las MAPK y la translocación sucesiva de NF- κ b al núcleo¹⁰. En contraste, la estimulación de receptores acoplados a proteínas G, como los receptores para las quimiocinas CXCL8 (IL-8) y CXCL1, resulta en la transición de CR3 y CR4 desde su estado de baja afinidad hacia el de alta afinidad mediante un mecanismo de señalización “inside-out”, el cual involucra la activación de PLC β 2, PLC β 3 y CalDAG-GEF1, (revisado en Bouti et al., 2021)¹¹. Cabe resaltar que hay ciertas moléculas que participan tanto en la señalización “inside-out” como en la “outside-in” ligada a CR3 tales como Rap1, RIAM, talina, kindlina y Syk¹¹⁻¹⁵.

1.2 Aminopeptidasa N (CD13)

CD13 (EC 3.4.11.2) es una ectoenzima de membrana celular con una masa molecular de entre 150 y 220 kDa, dependiendo del estado de glicosilación. Se le conoce también como aminopeptidasa N debido a su capacidad para escindir aminoácidos (preferentemente neutros) del extremo amino terminal de los péptidos. La actividad de CD13 es dependiente de Zn²⁺, por lo tanto, se considera una metaloproteasa. CD13 se expresa en varios tipos celulares tales como células epiteliales, células mieloides y durante los estadios iniciales de la diferenciación de linfocitos¹⁶. La mayoría de sus 960 residuos de aminoácidos (aa) se localizan extracelularmente, mientras que, alrededor de 25 residuos

de aa constituyen su único pase transmembranal, y únicamente de 7 a 10 residuos de aa forman la porción intracelular de la proteína¹⁷.

Los segmentos intracelular y extracelular de CD13 tienen funciones distintas. Por un lado, la actividad catalítica de CD13, localizada en los dominios extracelulares, es responsable de su papel en el procesamiento de péptidos bioactivos. Por el otro, a pesar de tener una porción intracelular muy corta con una sola tirosina fosforilable y no poseer motivos de señalización clásicos (e.g. ITAMs), CD13 es capaz de transducir señales luego de ser entrecruzado mediante anticuerpos monoclonales, función que además es independiente de su actividad enzimática. Se han descrito varias moléculas de señalización asociadas a CD13. Por ejemplo, Santos et al.¹⁸ reportaron que la estimulación de CD13 con anticuerpos monoclonales induce la fosforilación de cinasas como JNK, p38 y ERK 1/2, además de generar la movilización de Ca^{2+} . Dicha movilización fue caracterizada más adelante por nuestro grupo en el trabajo de Garay-Canales et al.¹⁹ donde se describió el efecto de distintos anticuerpos anti CD13 en el flujo de Ca^{2+} intracelular. Otro ejemplo es el publicado por nuestro grupo en 2006, en el que Mina-Osorio et al.²⁰ encontraron que el factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) Sos1 y la proteína adaptadora Grb2 co-precipitan con CD13 de células U937 en reposo; mientras que dicha co-precipitación disminuye cuando las células experimentan una agregación homotípica mediada por CD13. Gracias a esta señalización, CD13 media procesos celulares tales como fagocitosis, migración celular y adhesión (revisado en Mina-Osorio, 2008)²¹.

Desde hace más de 20 años se conoce la expresión de CD13 en células fagocíticas del linaje mielomonocítico²², sin embargo, fue en 2005 cuando Mina-Osorio y Ortega²³ establecieron que esta molécula de superficie interactúa de manera funcional con receptores para el Fc de inmunoglobulinas G en monocitos humanos, específicamente con el $Fc\gamma R1$. Demostraron que CD13 se redistribuye hacia la copa fagocítica durante la fagocitosis mediada por los $Fc\gamma R$ y, de manera importante, las presas fagocíticas que interactúan simultáneamente con ambos receptores son internalizadas más eficientemente que cuando interactúan únicamente con el $Fc\gamma R$. Además, observaron que este fenómeno se refleja en la duración de la fosforilación de Syk, es decir, el co-entrecruzamiento de CD13 y $Fc\gamma R1$ con anticuerpos monoclonales resulta en una fosforilación más prolongada que sólo el entrecruzamiento de $Fc\gamma R1$. En línea con estos resultados, en 2011 Gabrilovac et al.²⁴ reportaron un hallazgo similar utilizando macrófagos de ratón, en los que observaron que CD13 co-localiza y es capaz de internalizar ovoalbúmina en conjunto con el receptor de manosa. Luego, en 2013, Villaseñor-Cardoso et al.²⁵ observaron algo semejante en macrófagos y células dendríticas humanas, en las cuales se registró una regulación positiva en la fagocitosis tanto de partículas de zymosan, como de *Escherichia coli* inactivada por calor, además de la redistribución de CD13 hacia la copa fagocítica y el fagosoma. Finalmente, en 2015, Licona-Limón y et al.²⁶ confirmaron el papel de CD13 como un

receptor fagocítico primario tanto en monocitos como en macrófagos humanos. Esto se hizo utilizando fagocitosis dirigida, la cual consiste en revestir eritrocitos de carnero con una capa de biotina, después con una de estreptavidina y por último con fragmentos $F(ab')^2$ de anticuerpos de cabra anti IgG murina biotinilados y ponerlos en contacto con células que previamente habían sido incubadas con fragmentos de anticuerpos monoclonales para la molécula deseada en la superficie celular. En el caso de Licona-Limón et al, dicha molécula fue CD13. De esta manera es posible dirigir presas fagocíticas (los eritrocitos de carnero) hacia un receptor en específico. La internalización de las presas a través de CD13 fue cuantitativamente comparable con la que se produce a través del $Fc\gamma R1$. También establecieron que este fenómeno es parcialmente dependiente de la fosforilación de Syk y que está asociado a la producción de especies reactivas de oxígeno. Además, la expresión de CD13 en la línea celular HEK293, la cual normalmente no presenta esta molécula de superficie, permitió que estas células no fagocíticas adquirieran la capacidad de internalizar eritrocitos dirigidos específicamente a CD13.

A finales de la década de los 80 y durante los 90 del siglo pasado era común encontrar artículos en los que se mencionaba a CD13 como marcador de células cancerosas, especialmente de leucemias, sin adentrarse demasiado en su posible participación en dichas patologías²⁷. Cabe mencionar que desde ese entonces se había reportado la coexpresión de CD13 y CD11b en esos padecimientos²⁸. En 1999, Riemann y cols. llamaron la atención hacia el papel de CD13 más allá de la caracterización celular mediante marcadores de superficie con su revisión clásica “CD13 – no sólo un marcador en la tipificación de leucemias”¹⁶. En ella, exponen la evidencia que estaba disponible hasta ese momento de la posible participación de CD13 en procesos fisiológicos, por ejemplo, la diferenciación de linfocitos T. En ésta, la adhesión a la matriz extracelular mediada por este receptor jugaría un papel dentro de la movilidad celular, además de que, de manera importante para la presente investigación, se menciona que ya se había propuesto una relación funcional entre peptidasas de membrana tales como CD13, CD10 y APA, e integrinas. Se planteaba que esta relación entre peptidasas y moléculas de adhesión ocurriría a través de la activación de moléculas de señalización intracelular como FAK, la cual se autofosforila tanto en respuesta a la unión de las integrinas con sus ligandos, como a la estimulación de receptores acoplados a proteínas G con sustratos de las peptidasas. Además, las integrinas y los receptores agonistas clásicos (como aquellos para citocinas o factores de crecimiento) comparten componentes de sus vías de señalización como Src y Syk. Esto dio pie a sugerir la idea de que partes (subunidades) de los receptores agonistas podrían interactuar físicamente con los complejos de señalización ensamblados por las integrinas y así activarse, y señalizar más eficientemente. En el caso específico de CD13 Ghosh et.² al reportaron que se co-localiza con la subunidad $\beta 1$ de integrinas en sitios de adhesión y en el borde delantero durante la migración celular tanto en fibroblastos embrionarios murinos, como en células epiteliales humanas. En el mismo trabajo

se expone que dicha co-localización coincide con la formación de un complejo membranal en el que participan CD13, la GTPasa ARF6, el GEF específico para ARF6, EFA6 y la proteína de andamiaje IQGAP1 que controla la internalización, distribución hacia endosomas y reciclaje a la membrana de la subunidad β 1. Esto hace factible que CD13 pudiera tener interacciones similares con otras integrinas.

2. HIPÓTESIS

El entrecruzamiento de CD13 induce cambios en el estado de activación y expresión de membrana de CR3 en la misma célula. Estos cambios son potencialmente activos metabólicamente al involucrar la participación de moléculas de señalización intracelular, el rearrreglo del citoesqueleto de actina y la secreción de citocinas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar si el entrecruzamiento de CD13 induce cambios en el estado de activación y expresión de membrana del receptor CR3 y proponer un modelo de señalización teóricamente viable en macrófagos derivados de monocitos humanos que conecte a ambos receptores.

3.2 Objetivos particulares

- 1) Determinar si el entrecruzamiento de CD13 con anticuerpos monoclonales produce la activación de CR3.
- 2) Determinar si la activación de CR3 causada por el entrecruzamiento de CD13 se modifica en presencia de inhibidores de moléculas que potencialmente participen en la vía de señalización que vincula a ambos receptores. Específicamente Src, Syk, PLC γ y actina.
- 3) Determinar si el entrecruzamiento de CD13 con anticuerpos monoclonales produce cambios en la expresión de membrana de CR3
- 4) Determinar si el cambio en la expresión de membrana de CR3 causado por el entrecruzamiento de CD13 se modifica en presencia de inhibidores de moléculas que potencialmente participen en la vía de señalización que vincula a ambos receptores. Específicamente Src, Syk, PLC γ y actina.
- 5) Determinar si los cambios en la activación de CR3 causados por el entrecruzamiento de CD13 se acompañan por la secreción temprana de citocinas
- 6) Generar una red de interacciones entre CD13, CR3 y Syk utilizando recursos bioinformáticos, particularmente bases de datos de ontologías moleculares y análisis de minería de texto para sugerir de manera racional, acotada y dirigida, los componentes de la vía de señalización de CD13 a CR3.
- 7) Proponer una vía de señalización de CD13 que desencadene la activación de CR3 con base en los dos puntos anteriores.

4. ANTECEDENTES

La posible conexión entre CD13 y CR3 está respaldada por evidencia *in vivo*, ya que ambas moléculas pueden encontrarse juntas en dominios funcionales dentro de la membrana celular llamados balsas lipídicas²⁹. Estas estructuras son fundamentales para la señalización celular, ya que reúnen componentes de vías específicas en proximidad, disminuyendo así la posibilidad de activación fortuita o bloqueo de señales provenientes de otras cascadas (revisado en^{30,31}).

En resumen: i) integrinas como CR3 pueden activarse mediante la interacción con otros receptores debido a un mecanismo conocido como señalización "inside-out", como es el caso con los FcγRs^{32,33}, con los cuales CD13 comparte la función de receptor fagocítico primario, así como la activación de varias moléculas de señalización; y ii) tanto CD13 como CR3 pueden mediar funciones tales como fagocitosis, adhesión y estallido respiratorio. Además de la ya mencionada convergencia física en balsas lipídicas²⁹, lo cual constituye un fuerte indicador de una relación funcional. Adicionalmente, algunas publicaciones han demostrado un vínculo funcional entre CD13 e integrinas: Carrascal et al. mostraron que la expresión de CD13 se asocia con la de la integrina αvβ3 en cáncer de mama³⁴, y Ghosh et al.² mostraron que CD13 modula el tráfico de la integrina β1 a través de IQGAP, ARF6 y EFA6 en el sarcoma de Kaposi y células epiteliales de cáncer cervical humano.

5. METODOLOGÍA

5.1 Reactivos y anticuerpos

Los siguientes reactivos fueron adquiridos del proveedor que se menciona en seguida.

- Medio RPMI-1640: Gibco Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA)
- Factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) recombinante humano (rh): PeproTech (Cranbury, NJ, EUA)
- Lymphoprep: Axis-Shield PoC AS (Oslo, Noruega)
- Suero fetal bovino (FBS): Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA)
- L-glutamina: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
- Estreptomocina: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
- Penicilina: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
- Hidrato de hidrocloreuro BAY 61-3606: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
- Inhibidor 1 de Src: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Hidrato de U-73122 hydrate: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Citocalasina D: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Solución de piruvato de sodio (100X): Gibco by Life Technologies (NY, EUA)
- Solución de aminoácidos no esenciales MEM (100X): Gibco by Life Technologies (NY, EUA)
- Ficina: Pierce (Rockford, IL, EUA)
- Anticuerpo monoclonal murino anti CD11b (activado) humano (IgG1, clona CBRM1/5) acoplado a FITC: Biolegend (San Diego, CA, EUA)
- Anticuerpo policlonal murino anti-CD11b humano (IgG1, clona ICRF44) acoplado a APC: Biolegend (San Diego, CA, EUA)
- Fragmentos F(ab)² policlonales de IgG de cabra anti-inmunoglobulina de ratón (G α M): Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, EUA)
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-inmunoglobulina de ratón (R α M) acoplado a FITC: Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA).

Todos los medios de cultivo fueron suplementados con 10% FBS inactivado por calor, a menos que se indique de otra manera en el texto, 2mM L-glutamina, 100 μ g/mL estreptomocina, 100U/mL penicilina, 1mM piruvato de sodio y 1% solución de aminoácidos no esenciales MEM.

Los anticuerpos monoclonales murinos IgG1 anti-CD13 humano (mAb C) y anti-CD32 humano (mAb IV.3) se produjeron y purificaron en nuestro laboratorio a partir de sobrenadantes de las hibridomas

correspondientes (ver Garay-Canales et al., 2018)¹⁹. Los fragmentos Fab se prepararon a partir de los anticuerpos purificados utilizando Ficina inmovilizada siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.2 Cultivo celular

La línea celular monocítica THP-1 se mantuvo según las recomendaciones de la compañía distribuidora (ATCC), es decir, en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37°C, en medio RPMI-1640 suplementado como se menciona en la sección anterior. Para su diferenciación en macrófagos, las células se sembraron a una densidad de 4.5 x 10⁶/placa de 10 cm o de 8 x 10⁵/pozo en placas de 6 pozos, en medio RPMI-1640 suplementado adicionado con 20nM forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) durante tres días. Al cuarto día se lavaron las células con PBS tibio y se incubaron con medio fresco durante 24 h antes de su uso.

Los experimentos que se llevaron a cabo utilizando células de donadores humanos se realizaron siguiendo las Guías Éticas del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad de México, México. Las células mononucleadas de sangre periférica (PBMCs) se aislaron de paquetes leucocitarios de donadores masculinos sanos obtenidos del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Secretaría de Salud, Ciudad de México, México, mediante centrifugación en un gradiente de densidad con Lymphoprep como está descrito en Garay-Canales et al., 2018¹⁹. Las PBMCs se lavaron tres veces con PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄ pH 7.4) por centrifugación a 400 g durante 10 min. Las células se resuspendieron en medio RPMI-1640 sin suero, complementado como se describió más arriba en el texto y se sembraron (5–6 x 10⁷ PBMCs/placa) en placas de cultivo de poliestireno de 100mm x 20mm, tratadas para cultivo celular (Corning, New York, NY, EUA). Los cultivos se incubaron durante 1 h a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂ para permitir que los monocitos se adhirieran a placa plástica. Las células no adherentes se eliminaron mediante un lavado suave. Las células adherentes, enriquecidas con monocitos (≥95% de pureza, determinada por citometría de flujo utilizando CD14 como marcador de la población monocítica), se cultivaron durante 7-10 días en medio RPMI-1640 complementado como se ha descrito y adicionado con 5 ng/mL rh M-CSF, a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂, para permitir que los monocitos se diferenciaron en macrófagos. Para los experimentos las células se cosecharon con un raspado suave y firme con un gendarme.

5.3 Activación de CD11b

Se incubaron 5 x 10⁵ macrófagos (derivados de THP-1 o de monocitos de sangre periférica) en placas de seis pozos en medio RPMI-1640 suplementado sin suero por un máximo de 12 h en presencia o ausencia de los inhibidores para Syk (BAY, 10μM), Src (SKI-1, 20μM), PLC_γ (U73122, 5μM) y la

polimerización de actina (Cyt D, 10 μ M). Las células se cosecharon mediante raspado suave con gendarme. Por cada muestra cosechada se incubaron 0.25 x10⁶ macrófagos en 0.2ml de medio RPMI-1640 suplementado sin suero, con 2.5 μ g de fragmentos Fab de mAb C (anti-CD13) durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron tres veces con el mismo medio y se incubaron con 4 μ g de fragmentos F(ab)'₂ G α M durante 30 min a 4°C. Inmediatamente después, las células se incubaron durante 10 min a 37°C. Luego de esto, se centrifugaron y el sobrenadante de algunas muestras se guardó a -20°C para su posterior uso en la medición de citocinas. Finalmente, las células se fijaron con 1% paraformaldehído (PFA) durante 10 min a temperatura ambiente (RT).

5.4 Citometría de flujo

Con el fin de cuantificar la activación o expresión de CR3, las muestras fijadas se lavaron dos veces con PBS frío y se tiñeron con 20 μ l de una dilución 1:20 de anticuerpo monoclonal murino anti-CD11b (activado) humano (IgG1, CBRM1/5) acoplado a FITC o anticuerpo policlonal murino anti-CD11b humano (IgG1, ICRF44) acoplado a APC, durante 40 min a 4°C. Las células se lavaron tres veces con PBS frío y se analizaron en el citómetro (Attune azul/violeta, Applied Biosystems-Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA). La tinción para CD13 o CD32 (Fc γ RII) se realizó en macrófagos THP-1 o MDMs incubados con 10 μ g Fab C (anti-CD13) o Fab IV.3 (anti-CD32) por cada 1 x10⁶ células en las mismas condiciones que los experimentos de activación de CR3, es decir, en medio RPMI-1640 suplementado sin suero durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron tres veces con el mismo medio y se incubaron con una dilución 1:400 del anticuerpo G α M-FITC durante 30 min a 4°C, luego se lavaron tres veces con PBS frío y se fijaron con 1% PFA durante 10 min a RT. La intensidad de fluorescencia se midió por citometría de flujo. Para el análisis de los datos se utilizó el software FlowJo V10.

5.5 Cuantificación de citocinas

Se utilizaron muestras provenientes de experimentos de activación de CR3 para cuantificar un panel de 12 citocinas. Específicamente, los sobrenadantes de células incubadas sin anticuerpos (Sin abs, control) y de células a las que se les entrecruzó CD13 (mAb C + anticuerpo secundario [sec]). Los sobrenadantes congelados se descongelaron lentamente en hielo y se cargaron como duplicados en dos placas Milliplex (Millipore Sigma, Darmstadt, Germany), una para detectar IFN- α y otra para IFN- γ , IL-12p70, IL-17a, IL-6, IL-1 β , IL-2, IL -8, IL-4, IL-10, CCL2, and TNF- α . Los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se midieron en un instrumento Luminex Multiplexing (Millipore Sigma, Darmstadt, Germany).

5.6 Ensamblaje de la red teórica de señalización celular

Se utilizaron las puntuaciones de interacción combinadas de la base de datos STRING para encontrar a las moléculas más cercanamente asociadas de manera funcional con CD13, Syk y CR3³⁵. En este contexto, una asociación funcional puede significar contacto físico, participación en la misma vía metabólica y/o proceso celular³⁶. Las puntuaciones de STRING son indicadores de la probabilidad de una interacción, dada la evidencia disponible, que es: la vecindad genética, fusiones de genes, coocurrencia de genes, experimentos, bases de datos curadas, minería de texto y homología de proteínas. Cada tipo de evidencia da lugar a una puntuación individual para cada par de proteínas. Las puntuaciones combinadas son calculadas integrando las puntuaciones individuales y corrigiendo por la probabilidad de observar estocásticamente la interacción. Las puntuaciones van del 0 al 1, siendo 1 el resultado más alto posible.

Aquellas moléculas de la primera capa de interacciones con la proteína de interés que tuvieron una puntuación alta (≥ 0.8) se consideraron apropiadas para nuestro estudio. Las proteínas resultantes se seleccionaron con base en los requisitos fundamentales de la vía de señalización particular que se buscaba proponer, es decir, cinasas no receptoras, proteínas adaptadoras capaces de vincular a CD13 con otros componentes de la vía, especialmente Syk, y moléculas reguladoras tales como fosfatasas o ubiquitina ligasas. También se consideraron otros receptores que nos pudieran proporcionar conocimiento sobre los mecanismos reportados para las interacciones “inside-out”, especialmente aquellos que tuvieran similitud con los receptores estudiados, CD13 y CR3: metaloproteasas, receptores fagocíticos, integrinas y otras moléculas de adhesión. El elemento de minería de texto de STRING, el sitio web The Gene Cards³⁷ y el repositorio PubMed³⁸ se utilizaron para evaluar la pertinencia de cada proteína seleccionada, es decir, para confirmar la función de cada nodo y su expresión a nivel de gen y proteína en células de linaje mielomonocítico. Finalmente, la red de interacciones resultante se curó manualmente de acuerdo con la evidencia experimental reunida a partir de publicaciones de nuestro laboratorio y de otros autores. Se utilizó el software Adobe Illustrator 2020 para la generación de los diagramas correspondientes a este apartado.

5.7 Análisis estadísticos

Se eligieron las pruebas estadísticas adecuadas dependiendo del tipo de datos a analizar; es decir, esencialmente dependiendo del número de condiciones a comparar. Se utilizó el software GraphPad Prism 8. Para los experimentos de entrecruzamiento de receptores en ausencia de BAY, el análisis estadístico que se realizó fue un ANOVA seguido de una prueba de Dunnett o Tukey de comparaciones múltiples (comparación entre varias condiciones) y, en el caso de células y controles incubados con

BAY (una sola comparación), se realizó una prueba t de Student pareada de dos colas. Los valores de p por debajo de 0.05 se consideraron significativos.

6. RESULTADOS

6.1 El entrecruzamiento de CD13 da como resultado la activación de CR3 (CD11b/CD18)

CR3 tiene dos estados conformacionales principales que corresponden a una afinidad alta o baja por sus ligandos, es decir, los estados activo e inactivo, respectivamente. Por un lado, el estado de alta afinidad se puede alcanzar ya sea interactuando con sus ligandos (señalización desde afuera hacia adentro, “outside-in”) o mediante la estimulación, a través de vías intracelulares, de otros receptores del sistema inmunológico, esto es, señalización “inside-out”. Por otro lado, CD13 interactúa funcionalmente con otros receptores inmunes, por ejemplo, aumenta la eficiencia fagocítica de partículas dirigidas específicamente hacia los receptores para inmunoglobulinas^{23,25,26}, lo que nos permite hipotetizar que también podría promover la interacción funcional con integrinas como CR3, promoviendo su activación. Cabe mencionar que, debido a la ausencia de reportes sobre un ligando natural para CD13, hasta ahora el entrecruzamiento con anticuerpos monoclonales ha sido el método de elección para estimular a este receptor^{18,39,40}.

Por lo tanto, se evaluó el estado de activación de CR3 (CD11b/CD18) luego del entrecruzamiento de CD13 en macrófagos humanos. Las moléculas de CD13 en la superficie de macrófagos THP-1 se entrecruzaron utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo completo anti-CD13 mAb C y como anticuerpo secundario, fragmentos $G_{\alpha}M$ F(ab)². El entrecruzamiento de CD13 se dejó transcurrir por 10 min a 37 °C. A continuación, las células se tiñeron con un anticuerpo monoclonal comercial acoplado a FITC que reconoce un epítipo que únicamente se hace accesible cuando CD11b se encuentra en su conformación de alta afinidad (activado) [FITC-anti-CD11b (activado)] y se analizaron en el citómetro de flujo. Primeramente, la población de interés se seleccionó de acuerdo con su tamaño y granularidad (Fig. 1A), luego se creó una ventana para discriminar eventos únicos (“singlets”. Fig. 1B) y finalmente, otra para la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF) en el canal BL1 (FITC, Fig. 1C y D).

La Fig. 1C muestra que el histograma de la fluorescencia de las células control sin estimular, teñidas con el anticuerpo anti-CD11b (activado) se superpone con la auto-fluorescencia de las células sin teñir. Los controles son células incubadas ya sea sin anticuerpos (Sin abs), o únicamente con anticuerpos secundarios (Solo sec). Los histogramas resultantes demuestran que la incubación en ausencia de un anticuerpo anti-CD13 no produce una señal inespecífica de anti-CD11b (activado). En contraste, el panel D muestra un histograma representativo de la activación de CR3 producida cuando se entrecruza a CD13 utilizando tanto el anticuerpo primario, como el secundario (mAb C + sec). La Fig. 1E muestra el promedio y la desviación estándar (SD) en la MIF producida por la señal del anticuerpo anti-CR3

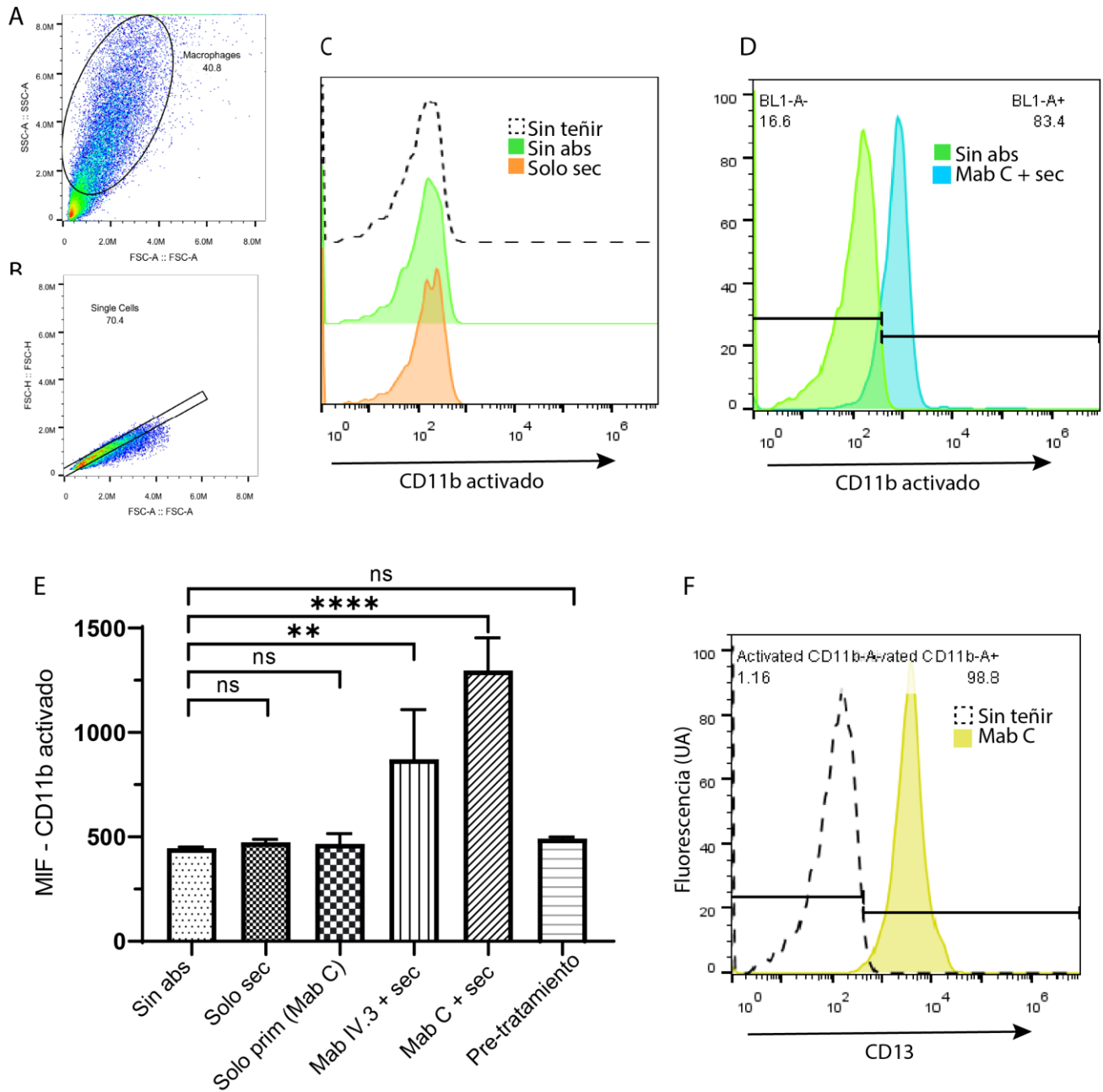


Figura 1. El entrecruzamiento de CD13 activa a CR3 en macrófagos THP-1. (A) En primer lugar, se seleccionaron las células según su tamaño y granularidad, luego (B) se seleccionaron las células individuales (“singlets”) y, finalmente, se evaluó (C,D) la MIF en el canal BL1 (FITC). (C) Controles. Células sin anticuerpos primarios y secundarios para entrecruzar a CD13 (“Sin abs”), únicamente con anticuerpos secundarios (“Solo sec”), teñidas con anticuerpos FITC-anti-CD11b (activado) o sin ningún anticuerpo para entrecruzar ni teñir (“Sin teñir”). (D) Histogramas representativos de una muestra entrecruzada con mAb C (anti-CD13) y anticuerpos secundarios en comparación con su control sin anticuerpos. (E) Promedio y desviaciones estándar de 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido de prueba de comparaciones múltiples ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, ns = no significativo. (F) Histograma representativo de más de 10 pruebas que demuestra que prácticamente todas las células son positivas para la tinción de CD13.

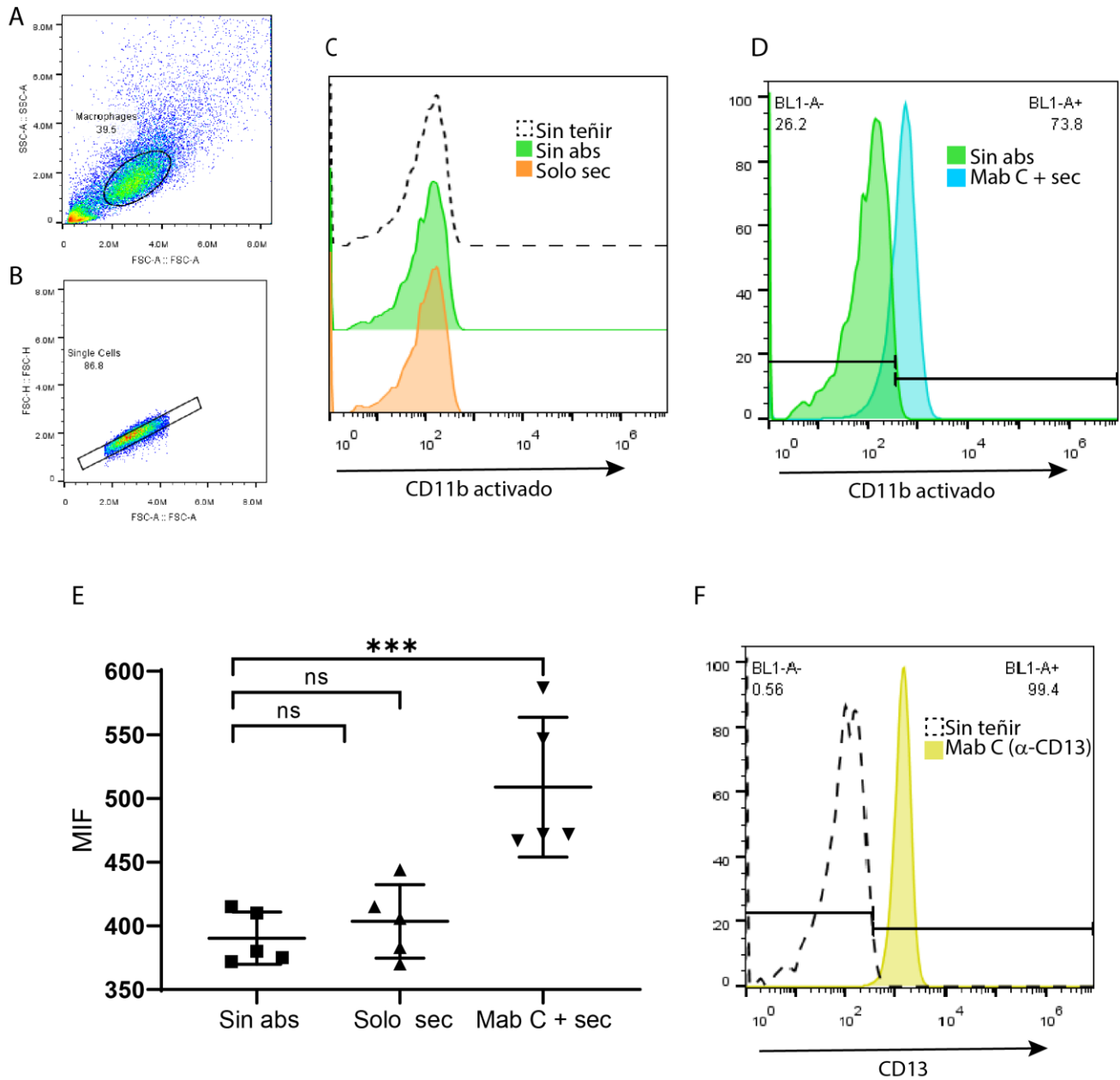


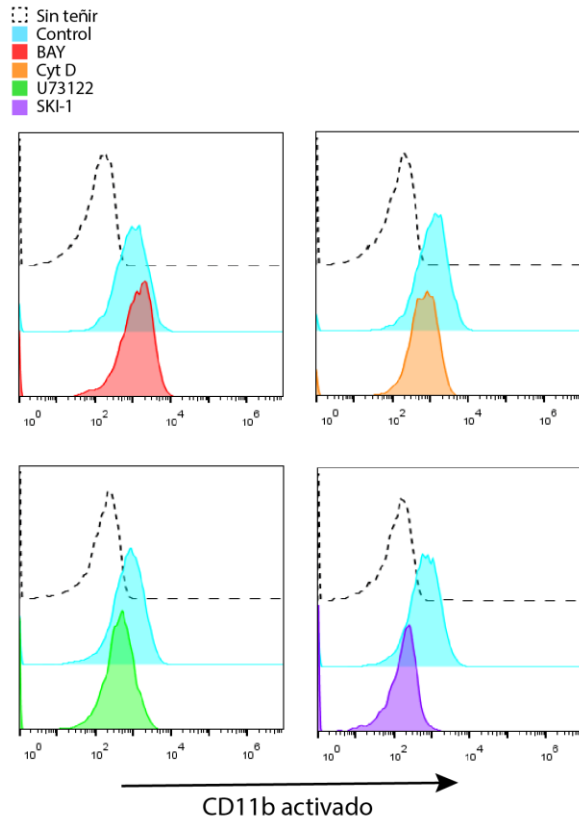
Figura 2. El entrecruzamiento de CD13 activa a CR3 en MDMs. Para analizar las muestras y controles se seleccionó la población de interés (MDMs) en el gráfico de puntos por tamaño y granularidad (A), luego por eventos que representaran una sola célula (“singlets”, B) y finalmente por la mediana de intensidad de fluorescencia (MIF) en el canal BL1 (FITC) (C y D). En el panel C se muestran los controles. Células sin anticuerpos primarios y secundarios para entrecruzar a CD13 (“Sin abs”), únicamente con anticuerpos secundarios (“Solo sec”), teñidas con anticuerpos FITC-anti-CD11b (activado) o sin ningún anticuerpo para entrecruzar ni teñir (“Sin teñir”). En el panel F se aprecia la activación de CR3 en un histograma representativo de una muestra en la que CD13 se entrecruzó con mAb C vs el control sin teñir. El panel E muestra el promedio y las desviaciones estándar de siete experimentos independientes. Se realizó un análisis de ANOVA de una vía, seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett para comprobar la significancia estadística de los resultados. *** $p < 0.001$, ns = no significativo. En el panel F se aprecia un histograma representativo mostrando que prácticamente todas las células son positivas para la marca de CD13.

(activado) en las células con CD13 entrecruzado y sus controles (n=3). Un análisis de varianza (ANOVA), seguido por una prueba de comparaciones múltiples confirma que los controles negativos, es decir, las células incubadas únicamente con los anticuerpos primario o secundario, así como los macrófagos recién cosechados (“pre-tratamiento”), no muestran una diferencia significativa con las células incubadas sin anticuerpos. Solo la activación de CR3 en células ya sea con CD32 (control positivo^{32,33}) o con CD13 entrecruzados, difiere significativamente de la activación registrada en células incubadas sin anticuerpos ($P < 0.01$ y < 0.0001 , respectivamente). La Fig. 1F es un histograma representativo de macrófagos THP-1 incubados con mAb C y anticuerpo secundario acoplado a FITC, lo que demuestra que el mAb C se une de manera eficiente a todas las células. Estos resultados fueron consistentes en MDM, lo cual se muestra en la Fig. 2.

6.2 Syk, Src, PLC γ y la polimerización de actina participan en la activación de CR3 desencadenada por el entrecruzamiento de CD13

Con el fin de comprender más a fondo la vía de señalización que conecta el entrecruzamiento de CD13 con la activación de CR3, algunas de las moléculas relacionadas con la señalización de estos receptores se inhibieron químicamente. Se evaluó cómo estos inhibidores afectan la activación de CR3 desencadenada por el entrecruzamiento de CD13. Para ello, los macrófagos THP-1 se pre-incubaron con los inhibidores de las moléculas de señalización Syk, BAY 61-3606 (BAY); Src, inhibidor de la cinasa Src-1 (SKI-1); PLC γ , U73122; y de la polimerización de actina (citocalasina D, Cyt D) o sin inhibidor (control) durante 3 horas en un medio libre de suero. Luego, las células se recolectaron y entrecruzaron las moléculas de CD13 en su superficie. Finalmente, la activación de CR3 se midió mediante citometría de flujo. La Fig. 3A muestra histogramas representativos comparando las células teñidas con el anticuerpo anti-CD11b (activado) con o sin inhibidores. El tratamiento con BAY potencia la señal que emite este anticuerpo, mientras que Cyt D, SKI-1 y U73122 la disminuyen. Tales diferencias fueron estadísticamente significativas y se representan en la Fig. 3B, donde se muestran el promedio y la desviación estándar de la proporción de cada muestra incubada con inhibidor en comparación con su respectivo control. Los valores de p para BAY y SKI-1 son < 0.0001 , y < 0.001 tanto para Cyt D como para U73122, respectivamente (n = 3). Estos resultados indican que Syk, Src, PLC γ y la polimerización de actina participan en la activación de CR3 desencadenada por el entrecruzamiento de CD13. Es importante destacar que la incubación con BAY tuvo los mismos efectos en los MDM humanos (Fig. 4). Desafortunadamente debido a restricciones surgidas de la pandemia de COVID-19 no fue posible obtener más muestras para probar los demás inhibidores en MDM humanos.

A



B

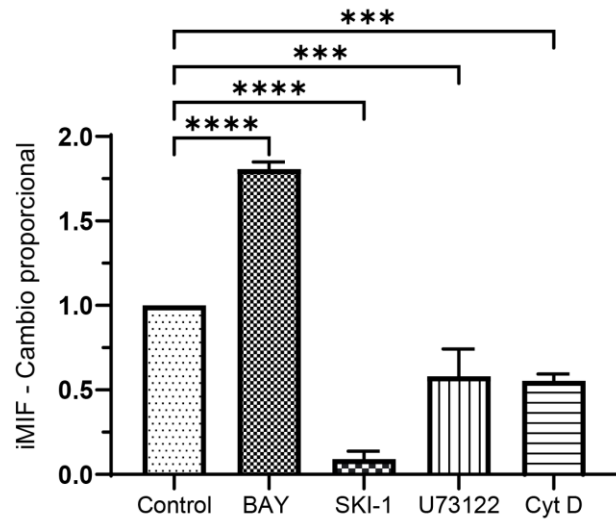


Figura 3. La inhibición de Src, PLC γ y de la polimerización de actina reduce la activación de CR3 (CD11b/CD18) desencadenada por el entrecruzamiento de CD13. La inhibición de Syk la potencia. (A) Histogramas representativos de la activación de CR3 en células con CD13 entrecruzado usando anticuerpos primario (anti-CD13) y secundario en presencia de inhibidores para Syk (BAY), polimerización de actina (Cyt D), PLC γ (U73122) y Src (SKI-1) o sin ellos (control). (B) Promedio y desviaciones estándar de la mediana de la intensidad de fluorescencia integrada (iMIF) a partir de 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido de prueba de comparaciones múltiples *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

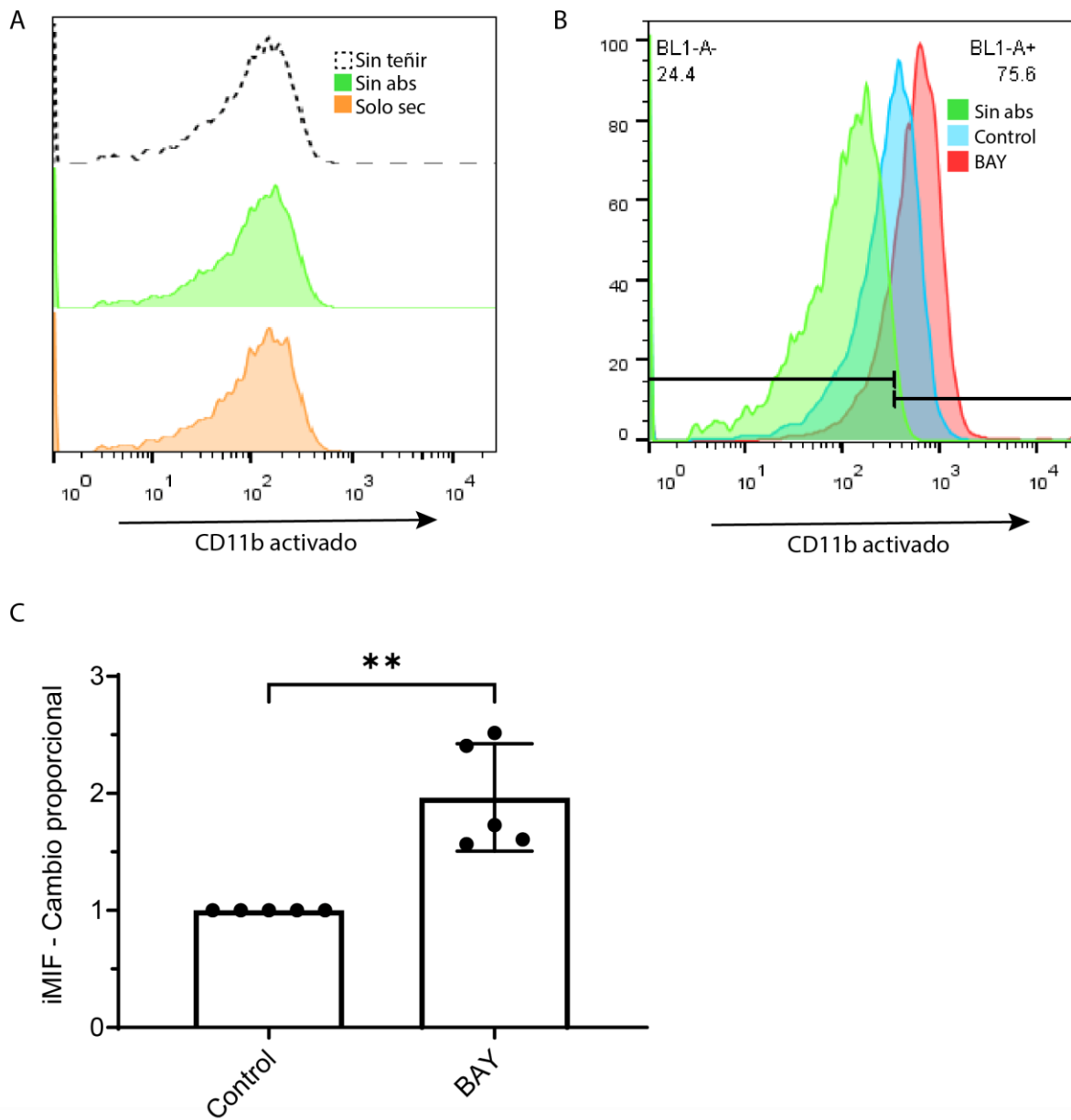


Figura 4. La inhibición de Syk potencia la activación de CR3 (CD11b/CD18) desencadenada por el entrecruzamiento de CD13 en los MDMs. (A) Controles. Células sin anticuerpos primarios y secundarios para entrecruzar a CD13 (“Sin abs”), únicamente con anticuerpos secundarios (“Solo sec”), teñidas con anticuerpos FITC-anti-CD11b (activado) o sin ningún anticuerpo para entrecruzar ni teñir (“Sin teñir”). (B) Promedio y desviaciones estándar de la iMIF a partir de 5 experimentos independientes. Prueba *t* de Student pareada de dos colas ** $p < 0.01$.

6.3 El entrecruzamiento de CD13 también controla la expresión de membrana de CR3

Se evaluó la expresión de membrana de CR3 utilizando citometría de flujo en macrófagos THP-1 con el fin de determinar si el entrecruzamiento de CD13 tiene algún efecto en la expresión de membrana de CR3. La Fig. 5A muestra histogramas representativos que indican que la señal de los controles (células incubadas sin anticuerpos o solo con anticuerpos secundarios) teñidas con un anticuerpo α -CD11b acoplado a APC prácticamente se superpone con la de las células sin teñir. En contraste, la Fig. 5B muestra que el entrecruzamiento de CD13 membranal induce la expresión de CR3 en la superficie de los

macrófagos. La Fig. 5C muestra el promedio y la desviación estándar de la MIF de la expresión de CD11b en macrófagos recién recolectados (condición previa al tratamiento con anticuerpos para entrecruzar a CD13, "pre-tratamiento"), células control y células en las que se entrecruzó CD13 a partir de tres experimentos independientes. La expresión de CR3 sigue el mismo patrón general que la activación de CR3, excepto para las células antes del tratamiento (dos incubaciones de 30 minutos a 4 °C, tres lavados y una incubación de 10 minutos a 37 °C). Las células teñidas antes del tratamiento tienen un nivel basal de CR3 significativamente diferente al de las células tratadas sin anticuerpos (control), lo cual se relaciona con el hecho de que CR3 es un marcador de diferenciación de macrófagos, como lo muestra la Fig. 6. Estos datos indican que la expresión basal de CD11b en la membrana disminuye después de tratar a las células en ausencia de anticuerpos o solo con anticuerpos primarios o secundarios. Solo el entrecruzamiento de CD13 restaura la expresión de membrana de CR3, incluso a un nivel superior al del pre-tratamiento.

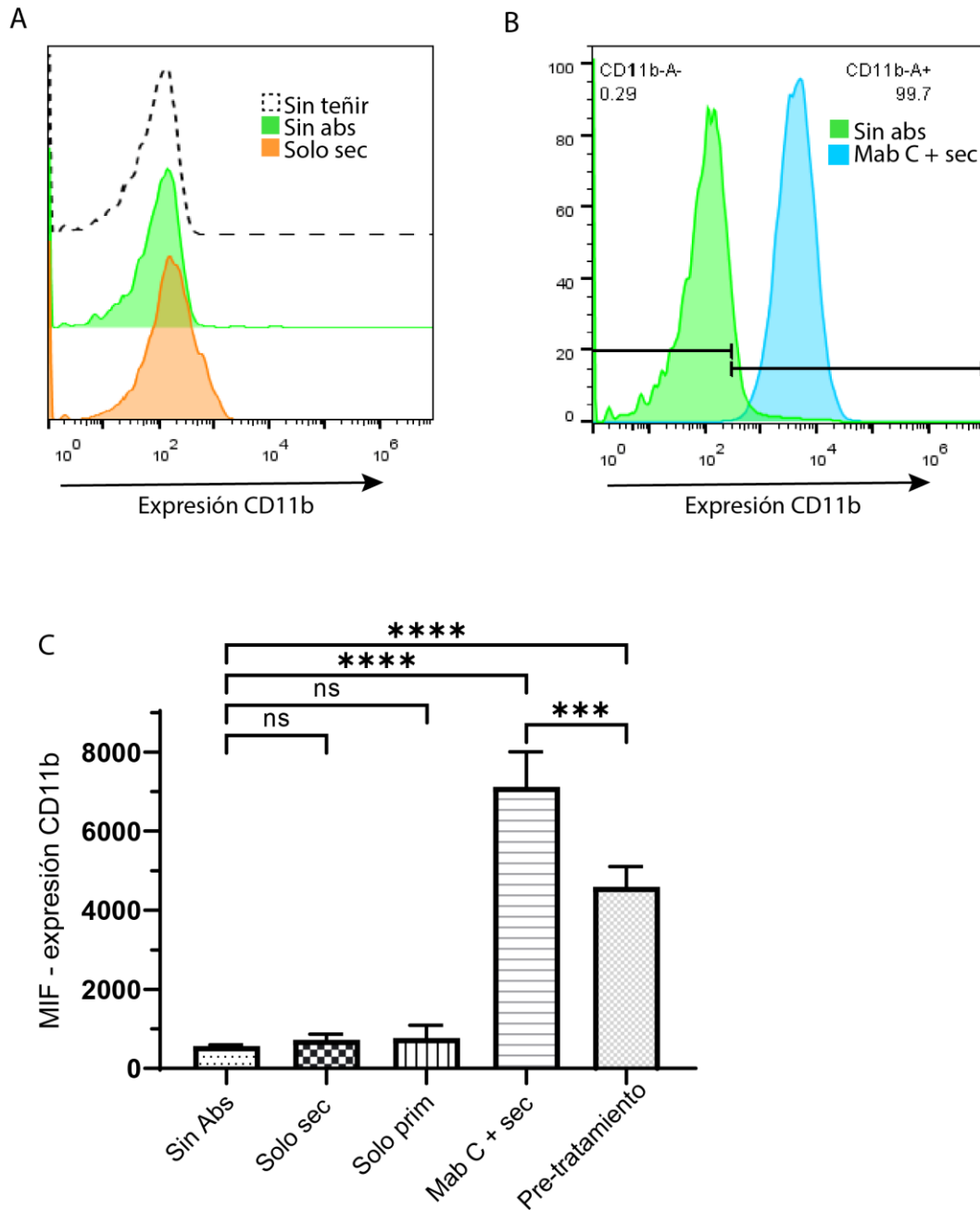


Figura 5. El entrecruzamiento de CD13 promueve la expresión en membrana de CR3 en macrófagos THP-1. (A) Controles. Células sin anticuerpos primarios y secundarios para entrecruzar a CD13 ("Sin abs"), únicamente con anticuerpos secundarios ("Solo sec"), teñidas con anticuerpos APC-anti-CD11b (total) o sin ningún anticuerpo para entrecruzar ni teñir ("Sin teñir"). (B) Histogramas representativos de una muestra entrecruzada con mAb C (anti-CD13) y anticuerpos secundarios en comparación con su control sin anticuerpos. (C) Promedio \pm desviación estándar de las MIF de la expresión de CD11b (total) en células tratadas. ANOVA de una vía, seguido de prueba de comparaciones múltiples *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns = no significativo.

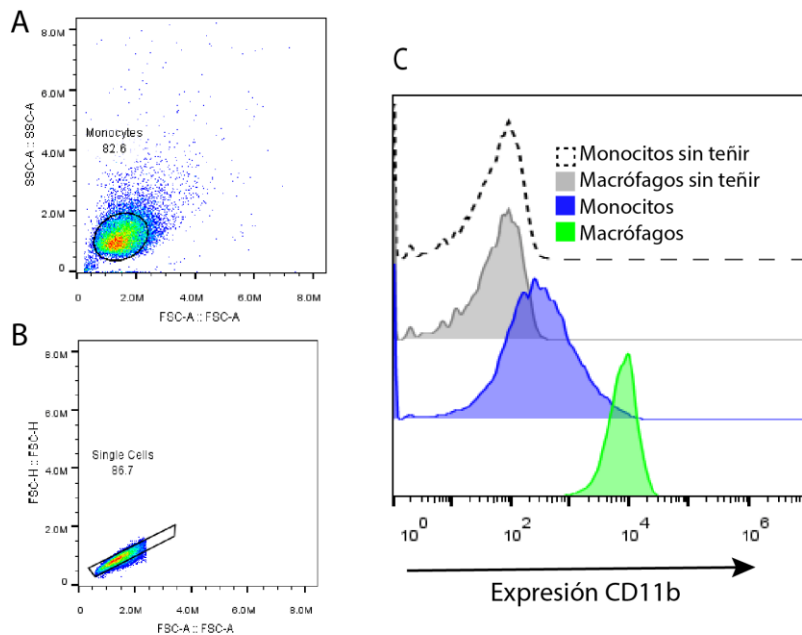


Figura 6. Aumento en la expresión en membrana de CD11b después de la diferenciación de monocitos THP-1 en macrófagos. (A) Las células fueron seleccionadas primeramente por tamaño y granularidad, luego por (B) eventos individuales (“singlets”) y, finalmente, por (C) MIF de la señal generada por las muestras incubadas con el anticuerpo policlonal APC-anti-CD11b (total) en el canal RL1. (C) Histogramas representativos de células THP-1 antes (monocitos) y después de la diferenciación (macrófagos) con PMA.

6.4 Src, PLC γ , Syk y la polimerización de actina también desempeñan un papel en la expresión de membrana de CR3

Después de confirmar que el entrecruzamiento de CD13 también influye en la expresión de membrana de CR3, se investigó la posibilidad de que la vía de señalización que controla este fenómeno y la que rige la activación de CR3 compartieran algunos de sus componentes. Para esto, se pre-incubaron macrófagos THP-1 con los inhibidores BAY (10 μ M), SKI-1 (20 μ M), U73122 (5 μ M) y Cyt D (10 μ M) o sin ningún inhibidor (control) durante 3 horas en un medio sin suero. Luego, se recolectaron las células y se entrecruzó CD13 en su superficie. Finalmente, se midió la expresión de membrana de CR3 utilizando citometría de flujo. La Fig. 7A muestra histogramas representativos comparando las células teñidas con anti-CD11b (total) después de la estimulación mediante el entrecruzamiento de CD13 en presencia de los diferentes inhibidores. El patrón es similar al observado en la activación de CR3: BAY potencia la señal producida por el anticuerpo acoplado a fluorocromo en comparación con el control, mientras que Cyt D, SKI-1 y U73122 la disminuyen. Tales diferencias se confirmaron estadísticamente y se representan en la Fig. 7B, donde se muestran el promedio y la desviación estándar de la proporción de cada muestra incubada con inhibidor en comparación con su respectivo control. El valor de p para SKI-1 fue <0.0001, <0.001 para BAY y Cyt D, y 0.0221 para U73122 ($n = 3$). Estos resultados

indican que Syk, Src, PLC γ y la polimerización de actina tienen un papel en la expresión de membrana de CR3 influenciada por el entrecruzamiento de CD13. La Fig. 8 muestra una comparación de la relación entre la activación/expresión de CD11b en células entrecruzadas en presencia de los diferentes inhibidores.

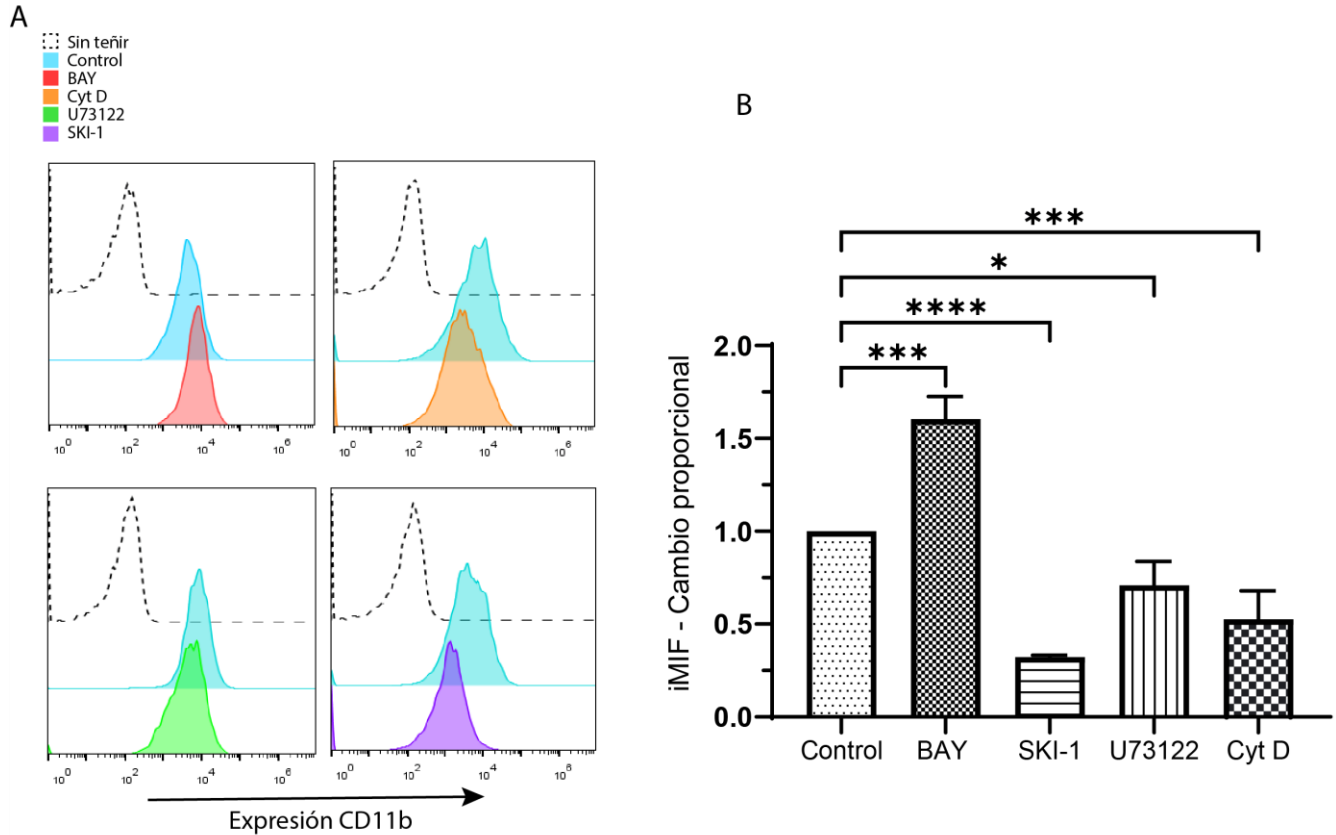


Figura 7. La inhibición de Src, PLC γ y la polimerización de actina reduce la expresión de membrana de CR3 desencadenada por el entrecruzamiento de CD13. La inhibición de Syk la potencia. (A) Histogramas representativos de la expresión de membrana de CR3 en macrófagos THP-1 con CD13 entrecruzado en presencia de inhibidores para Syk (BAY), la polimerización de actina (Cyt D), PLC γ (U73122) y Src (SKI-1). (B) Promedio y desviaciones estándar de la iMIF a partir de 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido de prueba de comparaciones múltiples * $p < 0.0221$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

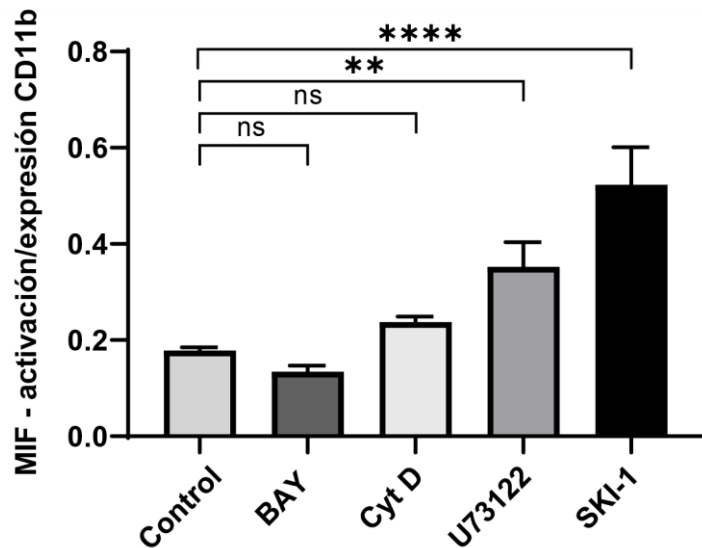


Figura 8. La proporción de CD11b activado con respecto a su expresión total en la membrana cambia con los inhibidores de PLC γ y Src, pero no con los de Syk o la polimerización de actina. Promedio y desviaciones estándar de la relación de activación/expresión de CD11b en macrófagos THP-1 con CD13 entrecruzado en presencia o ausencia (control) de diferentes inhibidores, n=3, ANOVA de una vía, seguido de prueba de comparaciones múltiples ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, ns = no significativo.

6.5 La activación de CR3 desencadenada por el entrecruzamiento de CD13 se acompaña de la secreción de citocinas inflamatorias

Las células del sistema inmunológico comúnmente responden a estímulos mediante la secreción de citocinas. La variedad de citocinas secretadas determina los eventos subsecuentes al estímulo original (por ejemplo, inflamatorios o antiinflamatorios). Es así como estas proteínas ayudan en gran medida a coordinar la respuesta local y sistémica. Por lo tanto, es de interés conocer el entorno generado, es decir, el perfil de citocinas que acompaña a la activación de receptores inmunológicos, en este caso, CD13 y CR3. Considerando esto, se midió un panel de 12 citocinas. De manera paralela se sometió a dos muestras de macrófagos derivados de células THP-1 al protocolo de activación de CR3 (dos incubaciones de 30 minutos a 4 °C, tres lavados y una incubación de 10 minutos a 37 °C). En un caso las células fueron incubadas sin anticuerpos (control) y en el otro, con anticuerpos primarios (mAb C) y secundarios (sec) para entrecruzar a CD13. Luego de la última incubación (10 minutos a 37 °C), se recolectaron los sobrenadantes libres de células y se utilizaron para determinar IFN- α , IFN- γ , IL-12p70, IL-17a, IL-6, IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-4, IL-10, CCL2 y TNF- α . Esto se repitió tres veces. Solo las citocinas proinflamatorias IFN- α ($p = 0.0154$), IFN- γ ($p < 0.01$), IL-12p70 ($p = 0.0283$) e IL-17a (<0.01) tuvieron un aumento significativo en su concentración en comparación con el control, como se observa en la Figura 9. La concentración de los interferones alcanzó un promedio de 30 pg/mL; es decir, un aumento con respecto a sus controles de 9.4 y 6.7 veces para IFN- α e IFN- γ , respectivamente. Las IL-12p70 e IL-17 se encontraron a una concentración promedio de 8 pg/mL; es decir, un aumento con respecto a

sus controles de 2.3 y 1.9 veces para IL-12p70 e IL-17a, respectivamente. A pesar de que otras citocinas como IL-8, TNF- α y CCL2 tienen concentraciones más altas, estas no fueron significativamente diferentes de sus controles.

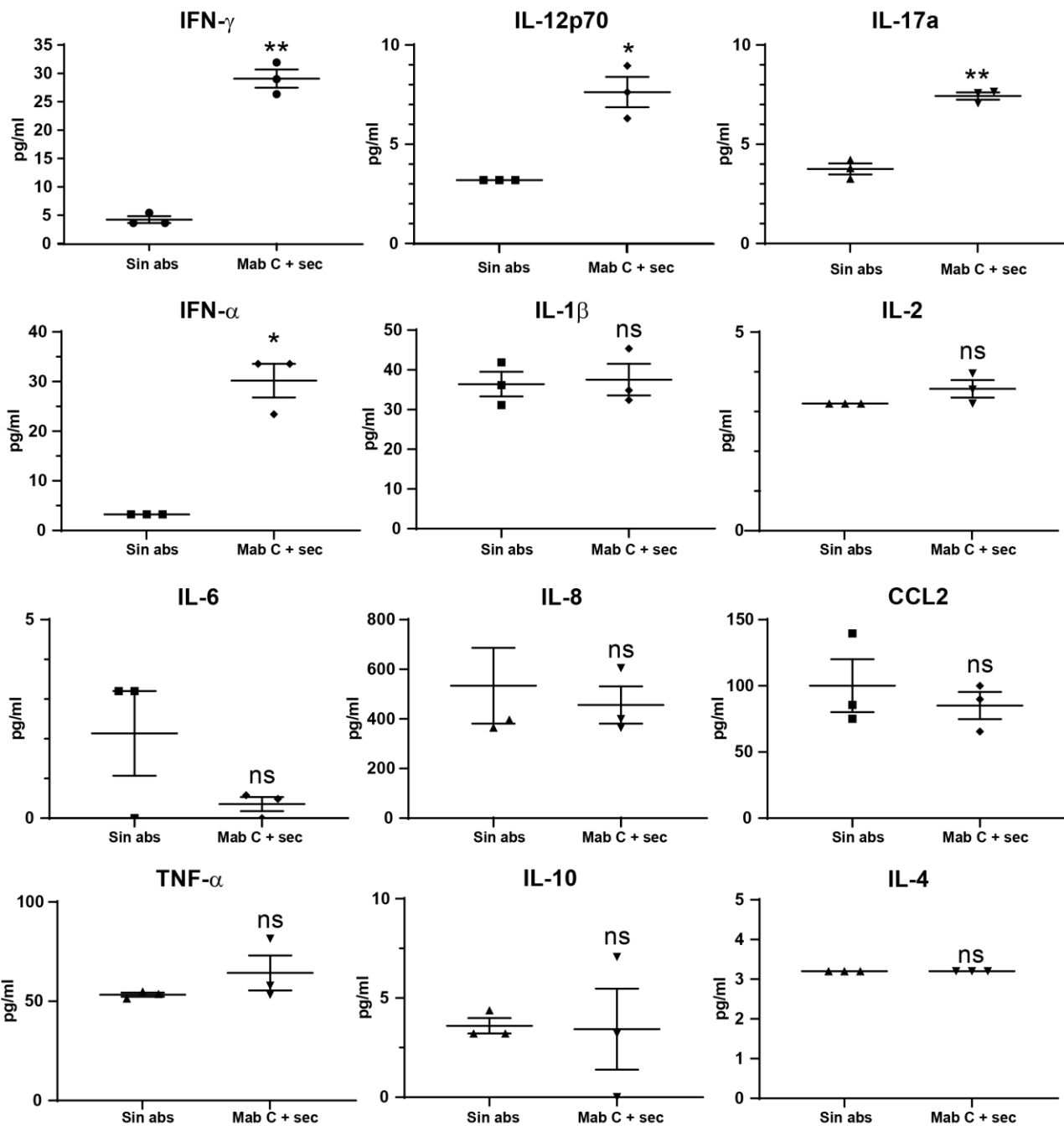


Figura 9. La activación de CR3 desencadenada por el entrecruzamiento de CD13 se acompaña de la secreción de citocinas proinflamatorias. Cuantificación de 12 citocinas presentes en el sobrenadante de células con CD13 entrecruzado y sus células de control tratadas sin anticuerpos. * $p < 0.05$ (0.0154 para IFN- α y 0.0283 para IL-12p70), ** $p < 0.01$, ns = no significativo. Promedio y desviaciones estándar a partir de 3 experimentos independientes.

6.6 La red de interacciones de proteínas asociadas más cercanamente de manera funcional a CD13, Syk y CR3 (CD11b/CD18) se compone de 76 proteínas

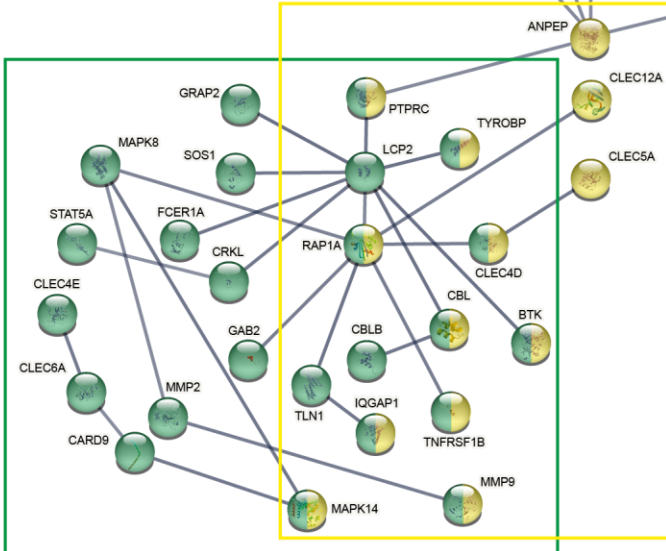
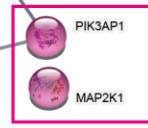
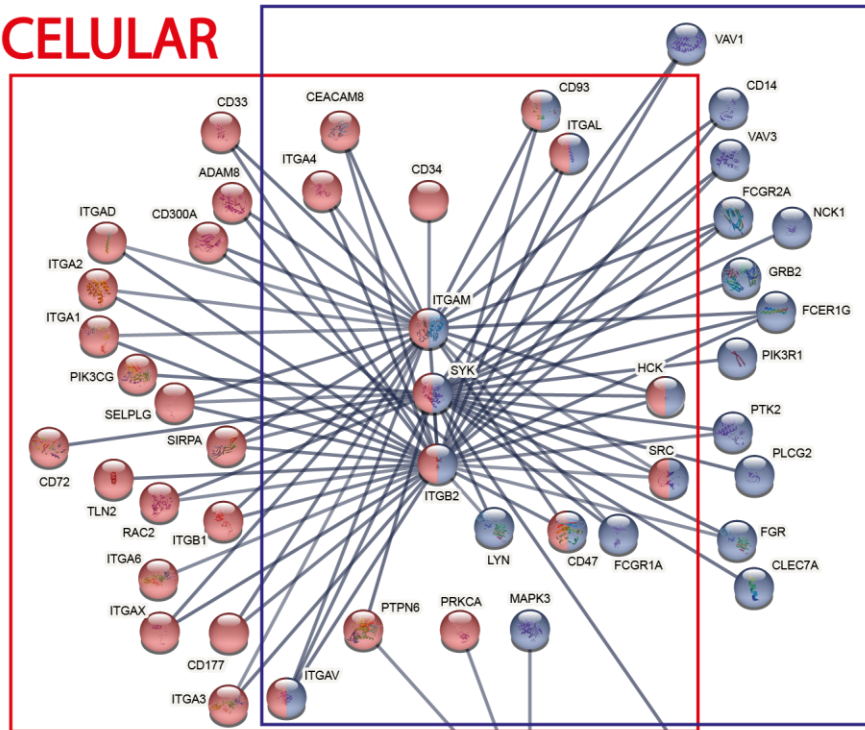
Los resultados anteriores mostraron que el entrecruzamiento de CD13 en macrófagos humanos primarios (MDM) y de línea celular (THP-1) induce la conformación de alta afinidad de CR3 y su expresión en la membrana plasmática. Por lo tanto, se recurrió a bases de datos bioinformáticas para ensamblar una red de interacciones compuesta por las moléculas asociadas funcionalmente a CD13, CR3 y Syk, una de las moléculas exploradas en los ensayos de inhibición química y una cinasa de señalización clave en el sistema inmunológico, en particular en las células mieloides, para proponer un modelo de mecanismo secuencial para la vía de señalización “inside-out” que podría explicar la activación de CR3 luego del entrecruzamiento de CD13.

Con el objetivo de tener una visión amplia de las posibles moléculas involucradas en un fenómeno que parecía tener más ramificaciones de las que se pensó inicialmente, se decidió utilizar herramientas bioinformáticas para construir una red de interacción de proteínas. Dicha red se construyó a partir de la información disponible en bases de datos públicas, la literatura y trabajos experimentales previos de nuestro laboratorio, y sirvió de guía para determinar el conjunto de proteínas y vías que probablemente participan en la cascada de señalización “inside-out” de CD13-CR3. Las proteínas para la red de interacción se seleccionaron con base en los requisitos fundamentales de la vía de señalización particular que se buscaba proponer, es decir, cinasas no receptoras, proteínas adaptadoras capaces de vincular a CD13 con otros componentes de la vía, especialmente Syk, y moléculas reguladoras tales como fosfatasa o ubiquitina ligasa. También se consideraron otros receptores que nos pudieran proporcionar conocimiento sobre los mecanismos reportados para las interacciones “inside-out”, especialmente aquellos que tuvieran similitud con los receptores estudiados, CD13 y CR3: metaloproteasas, receptores fagocíticos, integrinas y otras moléculas de adhesión. Dado el alto número de candidatos potenciales, los nodos de la red se seleccionaron utilizando el puntaje de interacción previsto, la función biológica y la presencia en el tipo celular deseado.

Se ensambló una red de interacciones de moléculas asociadas funcionalmente con CD13, Syk y CR3 seleccionando las proteínas con las puntuaciones combinadas más altas (≥ 0.8) de la base de datos STRING³⁵, así como aquellas cuya asociación funcional ha sido demostrada experimentalmente por nuestro grupo y otros autores. El elemento de minería de texto de STRING y las bases de datos The Gene Cards³⁷ y PubMed³⁸ se utilizaron para confirmar que las proteínas seleccionadas estuvieran presentes en el linaje mielomonocítico. La figura 10 presenta los grupos de ontología principales de las proteínas seleccionadas. Para aquellos nodos de consulta que resultaran en más de 50 proteínas con

ADHESIÓN CELULAR

FAGOCITOSIS



REGULACIÓN POSITIVA DE LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE RECEPTORES DE SUPERFICIE CELULAR

ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN CÉLULAS MIELOIDES

Figura 10. Ontología molecular de las proteínas seleccionadas mediante bases de datos informáticas. Este diagrama presenta las funciones principales por las cuales se incluyeron en nuestra red de interacciones estas proteínas. Cada recuadro encierra todas las proteínas dentro de una misma categoría sin llegar a ser un diagrama de Venn. La adhesión celular y la fagocitosis destacan como los procesos principales en los que participan las proteínas seleccionadas. Esta imagen se realizó en Adobe Illustrator 2020.

puntuaciones combinadas mayores o iguales a 0.8 se analizaron las 50 moléculas con las puntuaciones más altas. El objetivo de esta red fue restringir el número de proteínas y vías de señalización que potencialmente participan en la cascada de señalización “inside-out” de CD13 a CR3.

Utilizando a Syk como nodo de consulta, se obtuvo una primera capa de interacciones de 158 proteínas con puntajes combinados de STRING por encima de 0.9. Cabe resaltar dos criterios de exclusión para las proteínas que formarían parte de la red. En primer lugar, se buscaba que fuesen las aquellas que interactuaran con los nodos de consulta (CD13, CR3 y Syk) con la mayor probabilidad, de tal manera que en general se consideraron únicamente aquellos que pertenecían a la primera capa de interacciones, es decir, que no había una molécula que actuara de puente entre la proteína de elección y el nodo de consulta, dicho de otra manera, que la interacción fuera lo más directa posible. Esto se logró con todos los nodos de consulta excepto con CD13 debido al número tan reducido de moléculas en su primera capa de interacciones. En segundo lugar, en el caso de resultados en donde el número de proteínas que interactuaban con el nodo de interrogación excedía el número límite de moléculas a analizar (50), no se incluyeron las interacciones por debajo de este puntaje, es decir, aquellas entre 0.8 y 0.9. Se seleccionaron veintinueve entradas de acuerdo con los criterios establecidos, es decir, representando interacciones funcionales conocidas de CD13 y/o CR3 o elementos potenciales para la vía de señalización “inside-out” que los conecta. Dos de estas proteínas también se seleccionaron en los análisis de CD11b y CD18. La Fig. 11 y la tabla 1 del Anexo incluyen las proteínas seleccionadas para ensamblar la red, y el diagrama de Venn (Fig. 11) permite identificar aquellas moléculas comunes a dos o más consultas.

Dado que CR3 está formado por dos cadenas polipeptídicas, CD11b (ITGAM) y CD18 (ITGB2), ambas se sometieron a la búsqueda y análisis. Para CD11b, la primera capa de interacciones con puntajes combinados de STRING por encima de 0.9 consistió en 167 proteínas, lo que resultó en 22 moléculas de interés. Diez de estas también se seleccionaron para CD18, así como las dos mencionadas previamente tanto para Syk como para CD18. El uso de CD18 como nodo de consulta resultó en 184 interacciones con un puntaje combinado de ≥ 0.9 . Se eligieron veinticinco moléculas de interés, trece de las cuales eran exclusivas de CD18, y el resto se compartía con Syk y CD11b, como se mencionó anteriormente.

El uso de CD13 como la consulta arrojó veintisiete moléculas con puntajes de interacción combinados de STRING de 0.8 o más; estas se filtraron a cuatro proteínas de interés utilizando el criterio de ser inhibidores o potenciadores de señales río abajo, moléculas de adhesión o correceptores que, según la minería de texto, podrían proporcionar información sobre las vías de señalización necesarias para la interacción con CD13. Finalmente, se incluyeron otras doce proteínas cuya interacción con CD13 se

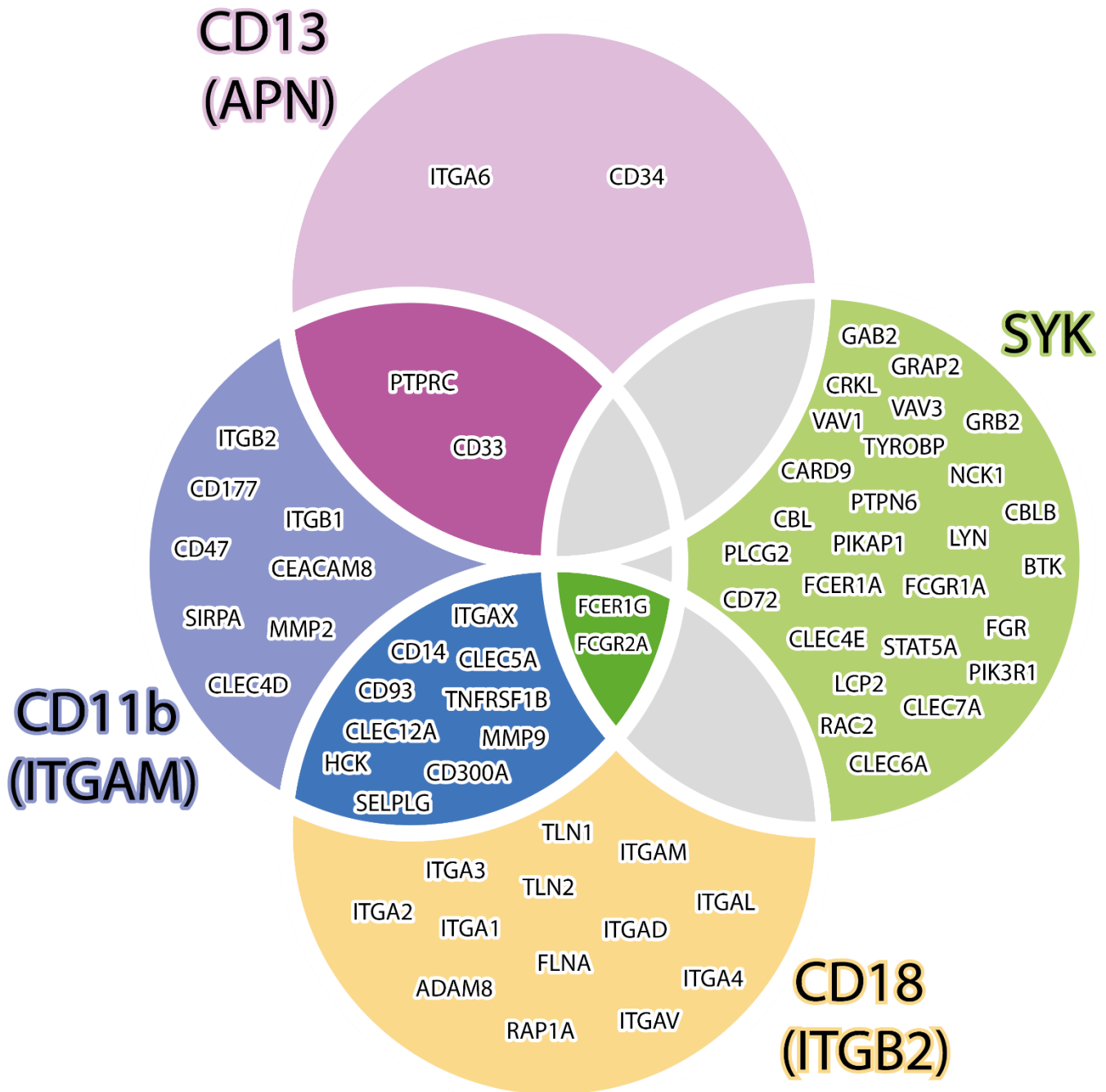


Figura 11. La consulta e interpretación de bases de datos bioinformáticos con respecto a CD13, Syk y CR3 (CD11b/CD18) resultó en 64 moléculas no redundantes que pudieran participar en la señalización “inside-out” entre CD13 y CR3. El diagrama de Venn muestra cada nodo de consulta de las bases de datos (STRING, Gene Cards y PubMed) como un círculo, dentro de ellos se encuentran las proteínas de interés seleccionadas según nuestros criterios, las moléculas que se seleccionaron en más de una consulta se encuentran en las intersecciones. Las áreas grises representan intersecciones sin proteínas en común. Esta imagen se realizó en Adobe Illustrator 2020.

determinó previamente de manera experimental por nuestro grupo y otros (SYK, GRB2, PI3K, FAK, IQGAP1, SRC, JNK, p38, MEK-1, PKC, ERK 1/2 y SOS1)^{18,39,41}. La Fig. 12 muestra la red de interacciones obtenida, compuesta por 76 proteínas no redundantes. Es importante destacar que las líneas y burbujas de color rosa representan interacciones determinadas experimentalmente, incluidas las contribuidas por este estudio. Una lista detallada de todas las proteínas en la red, sus principales características y sus nodos de consulta correspondientes se presentan en la Tabla 1 del Anexo. A continuación, con base en la red de interacciones generada, se construyó un modelo de mecanismo secuencial de la vía de señalización “inside-out” de CD13-CR3.

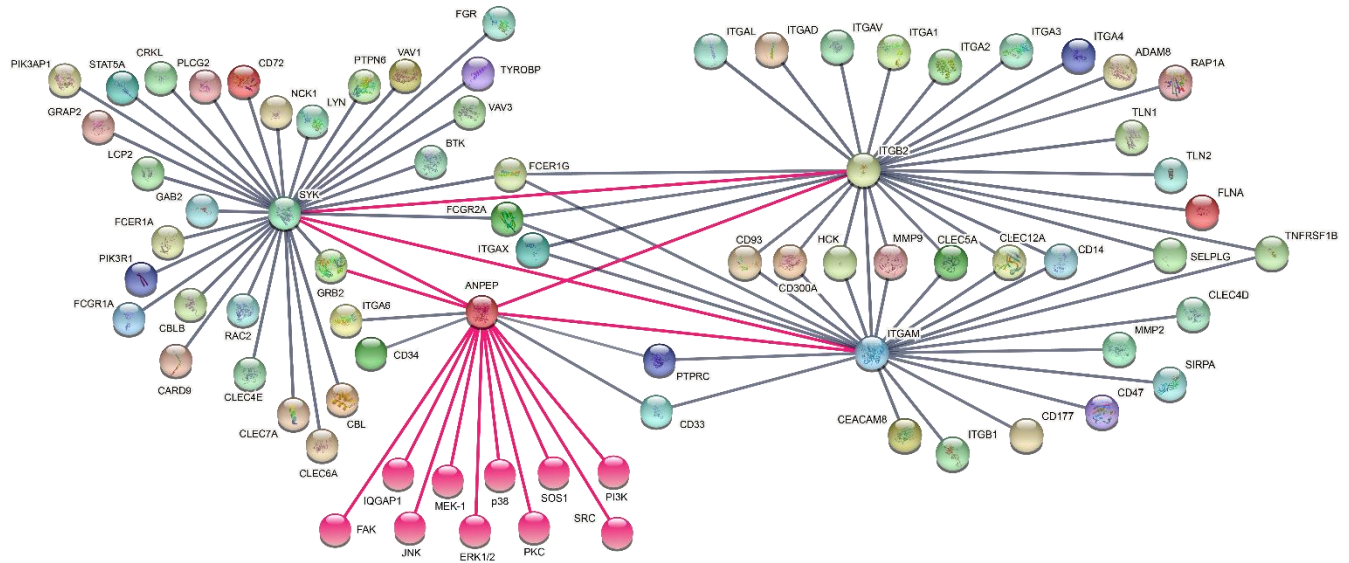


Figura 12. La red de interacción de proteínas de interés asociadas con CD13, Syk y CR3 contiene 76 nodos. La red de interacción de los socios funcionales de CD13, Syk y CR3 contiene 76 proteínas. Resultados no redundantes del análisis de moléculas que interactúan con CD13, Syk y CR3 con el mayor puntaje de interacción en STRING. Las líneas y burbujas de color rosa representan las interacciones determinadas experimentalmente en nuestro laboratorio y por otros. Esta imagen se realizó en Adobe Illustrator 2020.

6.7 Modelo del mecanismo secuencial de la vía de señalización “inside-out” de CD13 a CR3

La Fig. 13 representa el modelo de mecanismo secuencial que planteamos como explicación para los eventos de activación y expresión de membrana de CR3 que ocurren como consecuencia de la estimulación de CD13. En este trabajo se propone que, tras el entrecruzamiento con anticuerpos, los dímeros de CD13 son fosforilados en su parte intracelular (Tyr6), muy probablemente por Src³⁹. Esto podría crear un sitio de anclaje para proteínas andamiaje o adaptadoras como Grb2, Grap2 o Gab2. Posteriormente, otras moléculas como Sos1, Syk y otras tirosina-cinasas no receptoras y fosfatasa como SHP-1 (PTPN6) podrían ser reclutadas y activadas. A continuación, PLCγ sería activada por una de esas cinasas, por ejemplo, PI3K. PLCγ produce IP3 y DAG. Dado que el IP3 induce la liberación de

Ca²⁺ del retículo endoplásmico, las enzimas dependientes de Ca²⁺ podrían llevar a CR3 a hacer la transición del estado de baja afinidad al de alta afinidad. Por ejemplo, la calpaina puede cortar y activar a la talina (TLN1/2) (revisado en ⁴²), que, junto con la kindlina, desestabiliza la interacción CD18-CD11b interfiriendo con el puente salino entre las subunidades de la integrina⁴³, activándola de esta manera. Es importante destacar que la liberación de Ca²⁺ es un efecto conocido del entrecruzamiento de CD13 por anticuerpos específicos¹⁹. Otra posibilidad es la intervención de los factores de intercambio de nucleótidos GDP/GTP (GEF) de Rap1, CalDAG-GEFI o II, que pueden activarse tanto directamente por el DAG producido por PLCγ como por el Ca²⁺ liberado en el citoplasma en respuesta a IP3⁴⁴. En este caso, el GEF de Rap1 catalizaría el intercambio de GDP/GTP en Rap1 y, después de la fosforilación por una cinasa como Fak o Src, la proteína RIAM se uniría a Rap1 a través de su dominio de asociación a Ras, y a PIP2 dentro de la membrana celular a través de su dominio de pleckstrina⁴⁵. Rap1 también se ancla a la membrana e interactúa con talina y kindlina, que, como se mencionó anteriormente, pueden activar CR3. Cabe mencionar que todas las PLC también pueden anclarse a la membrana plasmática a través de un dominio de pleckstrina⁴⁶. Adicionalmente, en este trabajo se propone que existe un mecanismo en paralelo para controlar la expresión de membrana de CR3. Una posibilidad es que el receptor entre en un ciclo de endocitosis mediado por clatrina, se transporte a endosomas de clasificación y, después sea reciclado a la membrana o bien sea ubiquitinado y degradado⁴⁷. El papel de Syk en este ciclo es la fosforilación de miembros de la familia de proteínas ubiquitina-ligasas Cbl, como Cbl y Cbl-b, ambos presentes en la red de interacción⁴⁸. Por lo tanto, estas ligasas podrían ubiquitinar una proporción de las moléculas de CR3 en el endosoma de clasificación, dirigiéndolas hacia el compartimento endosomal tardío, mientras que otra proporción de las moléculas de CR3 endocitadas podría reciclarse de nuevo hacia la membrana en un circuito corto mediado parcialmente por F-actina, el blanco de Cyt D⁴⁹. Esto es concebible ya que los monocitos/macrófagos derivados de médula ósea murina deficientes en Cbl muestran una adhesión mediada por integrinas β2 mejorada durante la activación dependiente de señalización “inside-out”⁵⁰. Es importante destacar que la ubiquitinación no significa necesariamente que las moléculas se degraden, ya que esta modificación química puede eliminarse en los endosomas tardíos, y los receptores reciclarse de nuevo hacia el citoplasma o a las membranas celulares (circuito largo), como ocurre con una proporción de EGFR después de la terminación de la señalización (revisado en⁵¹).

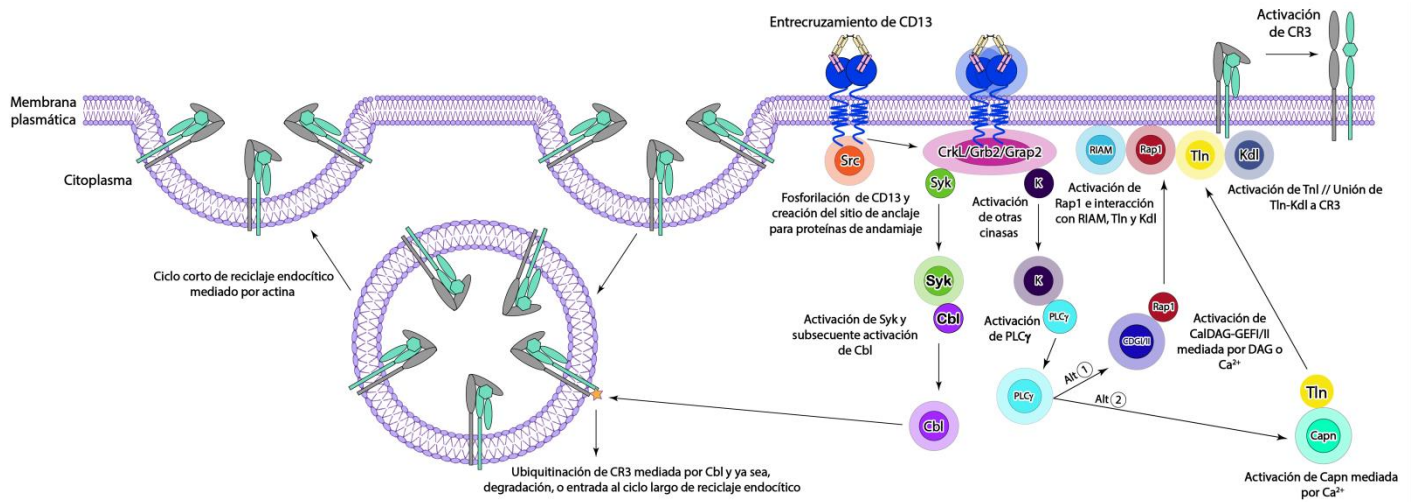


Figura 13. Modelo del mecanismo secuencial de la vía de señalización “inside-out” de CD13 a CR3. Representación esquemática de los eventos principales propuestos dentro de la vía de señalización teórica que vincula el entrecruzamiento de CD13 con la activación y expresión de membrana de CR3. Esta imagen se realizó en Adobe Illustrator 2020.

7. DISCUSIÓN

CD13 es una ectopeptidasa que, junto con otras proteínas de membrana con actividad enzimática, como CD157, CD73, CD38 y CD26, puede iniciar eventos de señalización tras su estimulación^{18,52}. A pesar de la necesidad de proteínas accesorias adicionales, la existencia de receptores sin actividad de tirosina cinasa (no-RTK) como estas ectopeptidasas puede haberse conservado durante la evolución ya que proporcionan un control más riguroso de la activación celular en comparación con los receptores de tirosina cinasa (RTK). A diferencia de los no-RTK, los RTKs pueden experimentar una activación espontánea por encuentros estocásticos en la membrana celular, lo que supone un riesgo cuando están sobreexpresados, ya que esto puede dar lugar al desarrollo de enfermedades. Por ejemplo, la sobreexpresión del RTK receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) se asocia con diversos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de ovario, próstata, gástrico, pulmonar y de mama. Además, la activación de HER2 sirve como un mecanismo conocido de resistencia al tratamiento endocrino en modelos experimentales⁵³.

CR3 es una proteína membranal heterodimérica formada por una cadena α (α M o CD11b) y una β (β 2 o CD18), es decir, forma parte del grupo de las integrinas β 2, las cuales se expresan exclusivamente en el sistema inmunitario de los vertebrados⁸. Estas integrinas pueden existir en dos estados conformacionales principales que corresponden a una alta o baja afinidad por sus ligandos, referidos como estados activo e inactivo, respectivamente. En el estado de baja afinidad las subunidades, que se encuentran lado a lado y ligeramente empalmadas, están flexionadas desde su segmento intermedio hacia la membrana. El estado de alta afinidad se alcanza cuando las subunidades rotan y se extienden mediante un movimiento similar al de una navaja de bolsillo (mecanismo "switchblade"⁵⁴), haciendo completamente accesibles los dominios que forman el sitio de unión al ligando. Esta activación puede inducirse tanto por señalización "outside-in", como por "inside-out" (revisado en^{8,9}). Planteamos la hipótesis de que CD13 podría interactuar funcionalmente con integrinas como CR3 al promover su activación, teniendo en cuenta los dos datos siguientes. En primer lugar, la estimulación de muchos receptores inmunes activa CR3 a través de la señalización de "inside-out", incluyendo, entre otros, a CD14, TLR2, TLR4, TLR9 y Fc γ Rs^{33,55,56}. En segundo lugar, CD13 interactúa funcionalmente con otros receptores inmunes, por ejemplo, el entrecruzamiento de CD13 con anticuerpos monoclonales aumenta la eficiencia fagocítica de partículas dirigidas a Fc γ Rs²³. Es importante destacar que, si bien es posible que al ser CD13 una proteína multifuncional reconozca a una variedad de ligandos naturales que estimulen la transducción de señales, éstos no se conocen aún. Por lo que hasta ahora el entrecruzamiento utilizando anticuerpos ha sido el estímulo de elección para este receptor^{18,39,40}.

Encontramos que CD13, un no-RTK con una porción citoplasmática corta y sin motivos de señalización canónicos⁴¹, activa CR3 y controla su expresión en la membrana. Nótese que la expresión de CD11b en la membrana no siempre indica activación, como se muestra en las diferentes proporciones de activación de CD11b/CD11b total en células tratadas con varios inhibidores. Esto respalda la idea de que el entrecruzamiento de CD13 desencadena dos fenómenos distinguibles: la expresión de membrana, que involucra a Syk y a la polimerización de actina, y la activación, que involucra a PLC γ . Ambos fenómenos se encuentran desglosados en el apartado 6.7 de la sección de resultados (“Modelo del mecanismo secuencial de la vía de señalización “inside-out” de CD13 a CR3”). Es importante destacar que el entrecruzamiento de CD13 es necesario para iniciar estos eventos de señalización ya nuestros datos indican que en ausencia de anticuerpos o en presencia únicamente de anticuerpos primarios o secundarios, CR3 se internaliza y solo se recicla de nuevo a la membrana mediante el entrecruzamiento de CD13, resta por determinar si este mecanismo es dependiente o independiente de clatrina, ya que ambas opciones se han reportado para CR3^{57,58}.

Los niveles de CD11b aumentan cuando los monocitos se diferencian en macrófagos, es decir, es un marcador de diferenciación. Esto explica parcialmente el mayor potencial de los macrófagos para la movilidad, adhesión y fagocitosis en comparación con sus precursores⁵. Tras la estimulación de los receptores inmunes, los factores asociados se activan y, en muchos casos, su expresión génica aumenta⁵⁹. Sin embargo, el entrecruzamiento de CD13 en la superficie de los macrófagos a 4°C, seguido de una breve incubación de diez minutos a 37°C, resulta en una expresión aún mayor de CD11b en la membrana celular que los niveles de diferenciación inicial (a los que nos referimos como "pre-tratamiento" en este texto). La interpretación de este fenómeno es que, en primer lugar, ciertos escenarios *in vivo* requieren que los niveles de CD11b en la membrana aumenten a tiempos más cortos de lo permitido por la expresión génica. De ahí la existencia de reservorios de receptores en forma de vesículas intracelulares⁶⁰. En segundo lugar, CD13 puede funcionar como centinela, detectando estímulos que requieren la activación y participación de CD11b, facilitando así una respuesta rápida a los desafíos inmunológicos. Las integrinas β 2, como CR3, participan tanto en procesos fisiológicos (e.g. adhesión, migración celular, fagocitosis) como en fisiopatológicos (invasión tumoral), por lo que es de gran importancia estudiar y entender los mecanismos que regulan su expresión y activación. Se pueden distinguir varios niveles de regulación de dichos mecanismos, desde el control de los cambios conformacionales (mediante señalización “outside-in” e “inside-out”) que se reflejan en las diferentes afinidades por sus ligandos, hasta la internalización y reciclamiento de secciones de la membrana plasmática que contienen un gran número de estos receptores⁶¹. Inicialmente, la expresión de membrana de las integrinas sintetizadas *de novo* parece estar mediada por talina ya que, además de unirse a la porción intracelular de las integrinas, presenta motivos putativos de exportación del retículo endoplásmico, sin embargo, aún no se conocen los detalles de este fenómeno⁶². En cuanto a la

internalización de las integrinas, se conocen mecanismos dependientes e independientes de clatrina. Los primeros son los más abundantes y estudiados; mientras que los segundos incluyen a la micropinocitosis y la formación de caveolas⁶¹. Una vez que se internalizan, las integrinas pueden ser degradadas en lisosomas, lo cual requiere la ubiquitinación de la cadena α , o ser recicladas a la membrana por una vía corta mediada por Rab4, o por una vía larga que pasa por el compartimento de reciclaje perinuclear y es mediada por Rab11 o Rab25⁶³. La internalización y reciclaje de integrinas es de especial importancia para la adhesión y migración de células adherentes⁶¹.

La selección de los diferentes inhibidores utilizados durante la realización de esta tesis se basó en los siguientes datos. Subramani y cols.³⁹ demostraron que el entrecruzamiento de CD13 en la línea celular monocítica humana U937 induce la adhesión a células endoteliales, y que este fenómeno está relacionado con la fosforilación del receptor por Src, así como con el reclutamiento de maquinaria de unión al citoesqueleto. Por lo tanto, se seleccionaron SKI-1 y Cyt D como posibles inhibidores de la vía de señalización de CD13 a CR3. Se probó BAY, un inhibidor de Syk altamente selectivo y ampliamente utilizado⁶⁴⁻⁶⁶, debido a que Syk actúa río abajo de varios receptores inmunes en células mielomonocíticas, incluyendo CD13 e integrinas^{26,66}. De hecho, Zheng y cols.⁶⁶ demostraron que después de que la glicoproteína VI de plaquetas humanas se une a su ligando, el colágeno, se desencadena una vía de señalización “inside-out”, activando Syk, que fosforila a PLC γ , lo que lleva a la activación de la integrina α IIb β 3. De ahí nuestra decisión de incluir también al inhibidor de PLC γ , U73122.

Nuestro modelo de mecanismo secuencial está respaldado tanto por interacciones predichas por STRING como por datos experimentales previos, lo que hace que la vía sea teóricamente concebible. Por ejemplo, elegimos Grb2 como una molécula adaptadora que conecta CD13 y Syk basándonos en hallazgos previos de nuestro laboratorio, en los que se reporta que CD13 entrecruzado co-precipita con Grb2. Además, esta molécula se asocia con Shc, Src, Syk y SHP-1 durante la señalización “inside-out” entre CD32a y la integrina α IIb β 3 en plaquetas humanas^{20,67}. Se han observado vías similares en otros sistemas, como la unión de PSGL-1 de neutrófilos humanos a las selectinas P y E endoteliales, activando así las integrinas β 2 CR3 y LFA-1 (revisado en¹¹). Otro ejemplo es Rap1, elegido por ser un regulador clave de la activación “inside-out” de integrinas fagocíticas como CR3, donde convergen señales de varios receptores⁶⁸. Estos hallazgos resaltan la eficacia de combinar enfoques experimentales y bioinformáticos para dilucidar vías de señalización complejas. Nuestro modelo amplía la comprensión de esta intrincada cascada de señalización “inside-out”.

Anteriormente se ha relacionado la producción de citocinas con la expresión de CD13 en varios tipos celulares y contextos⁶⁹⁻⁷³. Sin embargo, solo un puñado de estudios han reportado la secreción de

citocinas como resultado de la estimulación de CD13 en células mieloides humanas. En un trabajo reciente de nuestro grupo, Pérez-Figueroa y cols.⁴⁰ incubaron neutrófilos humanos durante 24 horas con los mismos anticuerpos primarios y secundarios que utilizamos en este estudio. Se utilizó un ensayo multiplex basado en perlas para determinar la producción de IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-6 e IL-10 en los sobrenadantes libres de células. De estos, solo IL-1 β y TNF- α mostraron un aumento significativo en comparación con el control. Del mismo modo, Santos y cols.¹⁸ demostraron que la ligación de CD13 en monocitos humanos U937 aumenta la expresión del ARNm de IL-8, alcanzando su punto máximo a las 2 horas de incubación. En contraste, Villaseñor-Cardoso y cols.²⁵ examinaron sobrenadantes de cDCs y macrófagos derivados de monocitos humanos en busca de IL-6, IL-12, IL-10 y TNF- α , pero no encontraron un aumento en su concentración después de 18 horas de entrecruzamiento de CD13. Este resultado podría deberse al uso de ELISA tipo sándwich, un método menos sensible. En este trabajo, medimos un panel de 12 citocinas y detectamos la presencia de citocinas proinflamatorias que acompañan la activación y el aumento en la expresión de la membrana de CR3 tan pronto como 10 minutos después del entrecruzamiento de CD13. Específicamente, IFN tipo 1 (IFN- α) y 2 (IFN- γ), IL-12p70 e IL-17a aumentaron significativamente. Como era de esperar para un tiempo tan corto después de la estimulación, las concentraciones fueron más bajas que lo que otros autores han reportado para macrófagos THP-1. Por ejemplo, detectamos aproximadamente 8 pg/mL de IL-12, mientras que Shabir y cols.⁷⁴ y Souissi y cols.⁷⁵ reportaron que los macrófagos THP-1 producen 100-125 pg/mL de IL-12, aunque de 4-18 horas después de la estimulación con 100 ng/mL de LPS, un potente inductor de citocinas proinflamatorias. Del mismo modo, Zhou y cols.⁷⁶ reportaron que 24 horas después de la infección con *Mycobacterium tuberculosis*, los macrófagos THP-1 secretan casi 300 pg/mL de IL-12. Por lo tanto, cuando se considera tanto el tiempo después de la estimulación como el método de detección, se hace evidente que aún existe una brecha de conocimiento con respecto a la respuesta temprana de citocinas después del entrecruzamiento de CD13. Por lo tanto, son necesarios experimentos de seguimiento y monitoreo de la expresión y secreción de citocinas entre 10 minutos y 18-24 horas para determinar si el entrecruzamiento de CD13 puede inducir concentraciones de citocinas similares a otros estímulos proinflamatorios. Sin embargo, las citocinas que detectamos son biológicamente relevantes para los procesos asociados a CD13. Los IFN tipo 1 son citocinas canónicas secretadas como parte de la respuesta antiviral⁷⁷; por lo tanto, se espera que un receptor viral, como CD13^{78,79}, impulse su producción. Esto se evidencia en el trabajo de Yamaya y cols.⁸⁰, quienes demostraron que los IFN tipo 1 se secretan después de que el coronavirus humano 229E, uno de los varios que causan resfriados comunes, interactúa con su receptor CD13 en la superficie de las células epiteliales nasales y traqueales humanas. IL-12 es una citocina secretada de manera temprana por células mieloides en respuesta a PAMPs y DAMPs, e induce la expresión y secreción de IFN- γ (revisado en⁸¹⁻⁸³). Cabe destacar que la subunidad p70 también es una de las dos subunidades que constituyen a IL-23, otro miembro de la familia de citocinas heterodiméricas IL-12.

En cualquier caso, tanto IL-12 como IL-23 contribuyen a las funciones de las subpoblaciones de linfocitos Th1 y Th17, respectivamente.

CR3 es un receptor extraordinariamente promiscuo al que se le conocen más de 100 ligandos, incluyendo opsoninas (e.g. iC3b), ácidos nucleicos (e.g. DNA), PAMP/DAMP (e.g. β -glucano, LPS), otros receptores (e.g. RAGE, Fc γ Rs), etc⁸⁴. Por lo que ciertamente existe la posibilidad de que la estimulación de CD13 resulte en la secreción de moléculas capaces de activar a CR3 mediante señalización “outside-in”. Sin embargo, en el contexto de los experimentos realizados en este trabajo se deben considerar al menos tres factores: el primero, las moléculas que se secretan al estimular a CD13. Hasta ahora únicamente se ha reportado la producción y liberación de especies reactivas de oxígeno y de algunas citocinas luego de la estimulación de CD13 con presas fagocíticas y/o entrecruzamiento mediante anticuerpos monoclonales^{18,40}. Segundo, la concentración de citocinas y el tiempo de exposición a ellas que se sabe tienen efecto sobre la expresión y los fenómenos en los que participa CR3. Por ejemplo, Munawara et al.⁸⁵ encontraron que exponer MDM a 40 ng/ml IL-13, TNF- α o IL-10 durante 24 h aumenta la expresión del mRNA de CD11b, mientras que la exposición a 40 ng/ml IL-1 β , TGF- β 1 o GM-CSF la disminuye, en tanto que la incubación con 40 ng/ml LT- α , IFN- γ , IL-4, IL-6 o M-CSF no tiene efecto. Otro ejemplo es el trabajo de Cross et al.⁸⁶, donde se observó que incubar MDM durante tres días con 10 U/ml TNF- α + GM-CSF incrementa su capacidad para fagocitar *Cryptococcus neoformans* a través de CR3. Y tercero, hasta el momento no se ha reportado a alguna citocina como ligando de CR3, sin embargo, como lo señala Ehlers⁸⁷, es común que la secreción de dichas moléculas subsiga a la activación de este y otros PRR, por lo que se puede ver como un segundo nivel de activación celular, junto con otros fenómenos como la agregación de PRR o la cooperación con otros receptores, como la que se da con CR4 o la inmunoglobulina receptora de complemento. Por supuesto que quedaría pendiente examinar si algún posible ligando de CR3 es secretado luego de la estimulación de CD13, sin embargo, el hecho de que en los experimentos de este trabajo los cambios en la activación y en la expresión de membrana de CR3 se observen a tiempos muy cortos (10 minutos) y que, tanto el tiempo de exposición de las células a las citocinas (minutos vs horas), como la concentración de éstas (un orden de magnitud de diferencia), sean bastante menores en comparación con los que se ha reportado para que exista un efecto sobre CR3, son indicadores importantes de que los fenómenos que aquí se reportan no están siendo inducidos por un mecanismo “outside-in”.

Nuestros resultados sugieren que CD13 y CR3 (CD11b/CD18) podrían colaborar en diversas funciones celulares, incluida la adhesión. Desde hace años, se ha relacionado a CD13 con eventos pro-adhesivos como la agregación^{88,89} y la invasión⁹⁰, mientras que CR3 es conocido por sus propiedades adhesivas y su activación en respuesta a la estimulación de otros receptores. Por ejemplo, en algunas personas

que reciben transfusiones de sangre, la activación de CD11b desencadenada por autoanticuerpos del antígeno 3a de neutrófilos humanos conduce a la acumulación de neutrófilos en la microvasculatura pulmonar, lo que provoca una grave lesión pulmonar aguda ligada a la transfusión⁹¹. Esto sugiere que CD13 y CR3 podrían participar en los mismos eventos de adhesión durante la migración transendotelial relacionada con la inflamación. Aunque nuestro grupo reportó previamente que la adhesión a células endoteliales mediada por CD13 es independiente de integrinas⁴¹, es importante destacar que CD11b no estaba entre las integrinas evaluadas. Esto podría explicar parcialmente la observación de que el entrecruzamiento de CD13 dificulta la migración transendotelial *in vivo*⁴¹. Dado que, como demostramos, la activación de CD11b es una consecuencia de la estimulación de CD13, una estimulación constante de CD13 mantendría a CR3 activo y en contacto constante con sus ligandos endoteliales como ICAM-1 e ICAM-2, JAM-A, JAM-C y RAGE⁷. Dicha estimulación continua podría llevar al arresto, polarización y la extensión celular, lo que potencialmente inhibiría la extravasación⁹². Aunque aún no se conoce con certeza, nuestros hallazgos sugieren que CD11b puede contribuir a este proceso. Se necesita investigación adicional para confirmar o descartar su participación.

CD13 y CR3 también podrían colaborar en la fagocitosis, ya que ambos receptores realizan esta función celular. Licona-Limón y cols.²⁶ demostraron que CD13 es un receptor fagocítico primario, capaz de mediar la internalización de presas fagocíticas dirigidas hacia CD13 en macrófagos humanos y monocitos THP-1. Incluso cuando se expresa en células HEK293 no fagocíticas, CD13 les permite internalizar el mismo tipo de partículas fagocíticas. En cuanto a CR3, su participación en la cascada del complemento está bien establecida. La activación del sistema del complemento conduce a la generación de moléculas opsonizantes como iC3b, que son reconocidas por CR3 para facilitar la fagocitosis (revisado en⁶). La fagocitosis mediada por CR3 puede ser potenciada sinérgicamente por otros receptores, como CR1, CD14 y receptores carroñeros, por ejemplo, durante la internalización de patógenos como *Francisella tularensis*⁹³ y *Borrelia burgdorferi*⁹⁴. Teniendo en cuenta que CD13 también actúa como un co-receptor para otros receptores fagocíticos como los receptores Fcγ y los receptores de manosa^{23,73}, es posible que exista una interacción funcional similar entre CD13 y CR3, al igual que ocurre entre CD44 y CR3, donde la fagocitosis mediada por CD44 desencadena, y depende parcialmente de la activación de CD11b⁹⁵.

CD13 se encuentra sobreexpresado en muchos tipos de cáncer, en los cuales la adhesión y la movilidad celular, fenómenos relacionados desde un punto de vista mecanicista, contribuyen de manera decisiva a la progresión tumoral⁹⁶⁻⁹⁸. Desde hace tiempo, la actividad de peptidasa de CD13 ha sido relacionada con la capacidad de las células de leucemia mieloide para resistir la apoptosis. El grupo de investigación del Profesor Kiyohiko Hatake en la Fundación Japonesa de Investigación del Cáncer ha dedicado décadas a investigar este fenómeno y ha reportado que cuando las células leucémicas se adhieren a las células endoteliales vasculares, CD13 facilita la degradación de la

citocina pro-apoptótica IL-8 producida por el endotelio^{99,100}. Por lo tanto, proponemos que CD13 desempeña un doble papel en este proceso. Inicialmente, promueve la adhesión de las células leucémicas al endotelio, un paso crítico en cualquier cascada metastásica, al activar CR3 y potencialmente otras moléculas de adhesión. Posteriormente, su actividad de peptidasa contribuye a la supervivencia celular al degradar a moléculas pro-apoptóticas secretadas por el sistema vascular.

7. PERSPECTIVAS

La investigación a futuro sobre la activación de CR3 como consecuencia de la estimulación de CD13 debería centrarse en identificar las funciones específicas que son coordinadas por estos receptores, es decir, en comprender el impacto funcional del entrecruzamiento de CD13 en la adhesión y la fagocitosis mediadas por CR3. También será necesario evaluar la participación de otros componentes de la vía de señalización propuesta que controlan de manera particular tanto la activación, como la expresión de membrana de CR3, tanto *in vitro* como *in vivo*. Un posible enfoque sería utilizar una estrategia de tamizado por CRISPR-Cas9 para interrumpir los genes que codifican los componentes de la vía de señalización de manera individual en células inmortalizadas y luego expandirlas en líneas celulares. Esto permitiría la caracterización de diversos aspectos de la vía de señalización, incluyendo la temporalidad de los eventos y las consecuencias de la ausencia de cada proteína. Además, sería importante evaluar la fosforilación en serina 8 y 10 en la porción citoplasmática de CD13, ya que aún no se ha reportado y podría representar sitios de anclaje adicionales para proteínas accesorias. Esta información podría proporcionar la base para el diseño de terapias que inhiban o potencien actividades celulares específicas para prevenir la propagación de los cánceres en los que CD13 está sobreexpresado.

8. CONCLUSIONES

En este estudio se utilizaron macrófagos humanos primarios (MDM) y diferenciados a partir de una línea celular monocítica (THP-1) para demostrar que la estimulación de la proteína multifuncional de membrana CD13 por medio de su entrecruzamiento con anticuerpos monoclonales desencadena eventos de señalización que involucran a Src, Syk, PLC γ y a la polimerización de actina. Esto se ve reflejado en la activación y la expresión de membrana del receptor CR3 (CD11b/CD18). Además, se encontró que dicha activación y expresión de membrana van acompañadas por la secreción de cantidades pequeñas, pero estadísticamente significativas de las citocinas IFN- α , IFN- γ , IL-12p70 e IL-17a. Los datos experimentales y bioinformáticos obtenidos durante la realización de esta tesis, así como los disponibles en la literatura nos permitieron generar una red de interacciones de proteínas que sirvió de base para proponer un modelo de mecanismo secuencial para la señalización “inside-out” de CD13 a CR3.

En conclusión, la comprensión de CD13 ha evolucionado desde ser considerado solamente como un marcador de leucemia hasta identificarse como un receptor y una enzima multifuncional. Este estudio revela que CD13 no solo desencadena una señalización “outside-in”, sino que también lo hace con la señalización “inside-out”, lo que lleva a la activación y expresión en la membrana de CR3 (CD11b/CD18), otro receptor inmunológico. Estos hallazgos resaltan la capacidad de CD13 para inducir fenómenos celulares comparables a los receptores fagocíticos clásicos, a pesar de la ausencia de motivos de señalización canónicos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Filippi MD. Neutrophil transendothelial migration: Updates and new perspectives. *Blood*. 2019;133(20):2149-2158. doi:10.1182/blood-2018-12-844605
2. Ghosh M, Lo R, Ivic I, et al. CD13 tethers the IQGAP1-ARF6-EFA6 complex to the plasma membrane to promote ARF6 activation, B1 integrin recycling, and cell migration. *Sci Signal*. 2019;12(579). doi:10.1126/SCISIGNAL.AAV5938
3. Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*. 2006;119(19):3901-3903. doi:10.1242/jcs.03098
4. Amberger JS, Bocchini CA, Schiettecatte F, Scott AF, Hamosh A. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an Online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(D1):D789-D798. doi:10.1093/nar/gku1205
5. Bednarczyk M, Stege H, Grabbe S, Bros M. $\beta 2$ Integrins—Multi-Functional Leukocyte Receptors in Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4). doi:10.3390/ijms21041402
6. Erdei A, Lukácsi S, Mácsik-Valent B, Nagy-Baló Z, Kurucz I, Bajtay Z. Non-identical twins: Different faces of CR3 and CR4 in myeloid and lymphoid cells of mice and men. *Semin Cell Dev Biol*. 2019;85:110-121. doi:10.1016/j.semcdb.2017.11.025
7. Sung S sang. Co-immunostaining of ICAM-1, ICAM-2, and CD31 in Mouse Kidney Glomeruli. *Bio Protoc*. 2020;10(13). doi:10.21769/bioprotoc.3663
8. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002;110(6):673-687. doi:10.1016/S0092-8674(02)00971-6
9. Lefort CT, Hyun YM, Schultz JB, et al. Outside-In Signal Transmission by Conformational Changes in Integrin Mac-1. *The Journal of Immunology*. 2009;183(10):6460-6468. doi:10.4049/jimmunol.0900983
10. Liu Y sheng, Wang L fen, Cheng XS, et al. The pattern-recognition molecule mindin binds integrin Mac-1 to promote macrophage phagocytosis via Syk activation and NF- κ B p65 translocation. *J Cell Mol Med*. 2019;23(5):3402-3416. doi:10.1111/jcmm.14236
11. Bouti P, Webbers SDS, Fagerholm SC, et al. $\beta 2$ Integrin Signaling Cascade in Neutrophils: More Than a Single Function. *Front Immunol*. 2021;11. doi:10.3389/fimmu.2020.619925
12. Retta SF, Balzac F, Avolio M. Rap1: A turnabout for the crosstalk between cadherins and integrins. *Eur J Cell Biol*. 2006;85(3-4):283-293. doi:10.1016/j.ejcb.2005.09.007
13. Torres-Gomez A, Sanchez-Trincado JL, Toribio V, et al. RIAM-VASP Module Relays Integrin Complement Receptors in Outside-In Signaling Driving Particle Engulfment. *Cells*. 2020;9(5). doi:10.3390/cells9051166
14. Wang D, Guo Q, Wei A, Li A. Differential Binding of Active and Inactive Integrin to Talin. *Protein Journal*. 2018;37(3):280-289. doi:10.1007/s10930-018-9776-8
15. Xue ZH, Feng C, Liu WL, Tan SM. A Role of Kindlin-3 in Integrin α M β 2 Outside-In Signaling and the Syk-Vav1-Rac1/Cdc42 Signaling Axis. *PLoS One*. 2013;8(2). doi:10.1371/journal.pone.0056911
16. Riemann D, Kehlen A, Langner J. CD13 - Not just a marker in leukemia typing. *Immunol Today*. 1999;20(2):83-88. doi:10.1016/S0167-5699(98)01398-X
17. Wong AHM, Zhou D, Rini JM. The x-ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(44):36804-36813. doi:10.1074/jbc.M112.398842
18. Santos AN, Langner J, Herrmann M, Riemann D. Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. *Cell Immunol*. 2000;201(1):22-32. doi:10.1006/cimm.2000.1629
19. Garay-Canales CA, Licona-Limón I, Ortega E. Distinct Epitopes on CD13 Mediate Opposite Consequences for Cell Adhesion. *Biomed Res Int*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/4093435
20. Mina-Osorio P, Shapiro LH, Ortega E. CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells. *J Leukoc Biol*. 2006;79(4):719-730. doi:10.1189/jlb.0705425
21. Mina-Osorio P. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends Mol Med*. 2008;14(8):361-371. doi:10.1016/j.molmed.2008.06.003
22. Heymann D, Guicheux J, Gouin F, Cottrel M, Daculsi G. Oncostatin M stimulates macrophage-polykaryon formation in long-term human bone-marrow cultures. *Cytokine*. 1998;10(2):98-109. doi:10.1006/CYTO.1997.0258
23. Mina-Osorio P, Ortega E. Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with Fc γ Rs in human monocytes. *J Leukoc Biol*. 2005;77(6):1008-1017. doi:10.1189/jlb.1204714
24. Gabrilovac J, Čupić B, Živković E, Horvat L, Majhen D. Expression, regulation and functional activities of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2; APN; CD13) on murine macrophage J774 cell line. *Immunobiology*. 2011;216(1-2):132-144. doi:10.1016/J.IMBIO.2010.06.005
25. Villaseñor-Cardoso MI, Frausto-Del-Río DA, Ortega E. Aminopeptidase N (CD13) Is involved in phagocytic processes in human dendritic cells and macrophages. *Biomed Res Int*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/562984

26. Licona-Limón I, Garay-Canales CA, Muñoz-Paleta O, Ortega E. CD13 mediates phagocytosis in human monocytic cells. *J Leukoc Biol.* 2015;98(1):85-98. doi:10.1189/jlb.2a0914-458r
27. Janossy G, Coustan-Smith E, Campana D. The reliability of cytoplasmic CD3 and CD22 antigen expression in the immunodiagnosis of acute leukemia: a study of 500 cases. *Leukemia.* 1989;3(3):170-181. Accessed August 30, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2465463/>
28. Pinto A, del Vecchio L, Carbone A, et al. Expression of myelomonocytic antigens is associated with unfavourable clinicoprognostic factors in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol.* 1991;2 Suppl 2:107-113. doi:10.1007/978-1-4899-7305-4_17
29. Orsó E, Werner T, Wolf Z, Bandulik S, Kramer W, Schmitz G. Ezetimib influences the expression of raft-associated antigens in human monocytes. *Cytometry Part A.* 2006;69(3):206-208. doi:10.1002/cyto.a.20229
30. Martinez VJ, Asico LD, Jose PA, Tiu AC. Lipid rafts and dopamine receptor signaling. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):1-18. doi:10.3390/ijms21238909
31. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science (1979).* 2010;327(5961):46-50. doi:10.1126/science.1174621
32. Petty HR, Worth RG, Todd RF. Interactions of integrins with their partner proteins in leukocyte membranes. *Immunologic Research* 2002 25:1. 2002;25(1):75-95. doi:10.1385/IR:25:1:75
33. Jongstra-Bilen J, Harrison R, Grinstein S. Fcγ-receptors Induce Mac-1 (CD11b/CD18) Mobilization and Accumulation in the Phagocytic Cup for Optimal Phagocytosis. *Journal of Biological Chemistry.* 2003;278(46):45720-45729. doi:10.1074/JBC.M303704200
34. Carrascal MA, Silva M, Ferreira JA, et al. A functional glycoproteomics approach identifies CD13 as a novel E-selectin ligand in breast cancer. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2018;1862(9):2069-2080. doi:10.1016/j.bbagen.2018.05.013
35. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D607-D613. doi:10.1093/nar/gky1131
36. von Mering C, Jensen LJ, Snel B, et al. STRING: Known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(DATABASE ISS.). doi:10.1093/nar/gki005
37. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2016;2016:1.30.1-1.30.33. doi:10.1002/cpbi.5
38. Agarwala R, Barrett J, Beck J, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D8-D13. doi:10.1093/nar/gkx1095
39. Subramani J, Ghosh M, Rahman MM, et al. Tyrosine Phosphorylation of CD13 Regulates Inflammatory Cell-Cell Adhesion and Monocyte Trafficking. *The Journal of Immunology.* 2013;191(7):3905-3912. doi:10.4049/jimmunol.1301348
40. Pérez-Figueroa E, Álvarez-Carrasco P, Ortega E. Crosslinking of membrane CD13 in human neutrophils mediates phagocytosis and production of reactive oxygen species, neutrophil extracellular traps and proinflammatory cytokines. *Front Immunol.* 2022;13:6681. doi:10.3389/FIMMU.2022.994496/BIBTEX
41. Mina-Osorio P, Winnicka B, O'Connor C, et al. CD13 is a novel mediator of monocytic/endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol.* 2008;84(2):448-459. doi:10.1189/jlb.1107802
42. Spinozzi S, Albini S, Best H, Richard I. Calpains for dummies: What you need to know about the calpain family. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2021;1869(5). doi:10.1016/j.bbapap.2021.140616
43. Sun Z, Costell M, Fässler R. Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces. *Nat Cell Biol.* 2019;21(1):25-31. doi:10.1038/s41556-018-0234-9
44. Schmid MC, Franco I, Kang SW, Hirsch E, Quilliam LA, Varner JA. PI3-Kinase γ Promotes Rap1a-Mediated Activation of Myeloid Cell Integrin $\alpha 4\beta 1$, Leading to Tumor Inflammation and Growth. *PLoS One.* 2013;8(4):e60226. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0060226
45. Cho EA, Zhang P, Kumar V, et al. Phosphorylation of RIAM by Src Promotes Integrin Activation by Unmasking the PH Domain of RIAM. *Structure.* 2020;29(4). doi:10.1016/j.str.2020.11.011
46. Fukami K, Inanobe S, Kanemaru K, Nakamura Y. Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance. *Prog Lipid Res.* 2010;49(4):429-437. doi:10.1016/J.PLIPRES.2010.06.001
47. Larocque G, Royle SJ. Integrating intracellular nanovesicles into integrin trafficking pathways and beyond. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2022 79:6. 2022;79(6):1-18. doi:10.1007/S00018-022-04371-6
48. Joshi S, Singh AR, Zulcic M, Durden DL. A PKC-SHP1 signaling axis desensitizes Fcγ receptor signaling by reducing the tyrosine phosphorylation of CBL and regulates FcγR mediated phagocytosis. *BMC Immunol.* 2014;15(1). doi:10.1186/1471-2172-15-18
49. Pyle SJ, Reuhl KR. Cytoskeletal Elements in Neurotoxicity. *Comprehensive Toxicology, Second Edition.* 2010;13:71-87. doi:10.1016/B978-0-08-046884-6.01306-3
50. Choi EY, Orlova V V., Fagerholm SC, et al. Regulation of LFA-1 dependent inflammatory cell recruitment by Cbl-b and 14-3-3 proteins. *Blood.* 2008;111(7):3607-3614. doi:10.1182/blood-2007-07-103077

51. Lu Z, Hunter T. Degradation of activated protein kinases by ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:435-475. doi:10.1146/annurev.biochem.013008.092711
52. López-Cortés GI, Díaz-Alvarez L, Ortega E. Leukocyte Membrane Enzymes Play the Cell Adhesion Game. *Front Immunol.* 2021;0:4841. doi:10.3389/FIMMU.2021.742292
53. Mazumder A, Shiao S, Haricharan S. HER2 Activation and Endocrine Treatment Resistance in HER2-negative Breast Cancer. *Endocrinology.* 2021;162(10). doi:10.1210/ENDOCR/BQAB153
54. Shimaoka M, Takagi J, Springer TA. Conformational Regulation of Integrin Structure and Function. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.31.101101.140922>. 2003;31:485-516. doi:10.1146/ANNUREV.BIOPHYS.31.101101.140922
55. Harokopakis E, Hajishengallis G. Integrin activation by bacterial fimbriae through a pathway involving CD14, Toll-like receptor 2, and phosphatidylinositol-3-kinase. *Eur J Immunol.* 2005;35(4):1201-1210. doi:10.1002/EJI.200425883
56. Han C, Jin J, Xu S, Liu H, Li N, Cao X. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. *Nature Immunology* 2010 11:8. 2010;11(8):734-742. doi:10.1038/ni.1908
57. Martín C, Uribe KB, Gómez-Bilbao G, Ostolaza H. Adenylate Cyclase Toxin Promotes Internalisation of Integrins and Raft Components and Decreases Macrophage Adhesion Capacity. *PLoS One.* 2011;6(2):e17383. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0017383
58. Bridgewater RE, Norman JC, Caswell PT. Integrin trafficking at a glance. *J Cell Sci.* 125:3695-3701. doi:10.1242/jcs.095810
59. Martínez de Paz A, Zvi Josefowicz S, Alexia Martínez de Paz C. Signaling-to-chromatin pathways in the immune system. *Immunol Rev.* 2021;300(1):37-53. doi:10.1111/IMR.12955
60. Nuutila J, Jalava-Karvinen P, Hohenthal U, et al. Comparison of degranulation of easily mobilizable intracellular granules by human phagocytes in healthy subjects and patients with infectious diseases. *Hum Immunol.* 2009;70(10):813-819. doi:10.1016/J.HUMIMM.2009.06.017
61. Margadant C, Monsuur HN, Norman JC, Sonnenberg A. Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr Opin Cell Biol.* 2011;23(5):607-614. doi:10.1016/J.CEB.2011.08.005
62. Martel V, Vignoud L, Dupé S, Frachet P, Block MR, Albigès-Rizo C. Talin controls the exit of the integrin $\alpha 5\beta 1$ from an early compartment of the secretory pathway. *J Cell Sci.* 2000;113(11):1951-1961. doi:10.1242/JCS.113.11.1951
63. Cullen PJ, Steinberg F. To degrade or not to degrade: mechanisms and significance of endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2018 19:11. 2018;19(11):679-696. doi:10.1038/s41580-018-0053-7
64. Jang JW, Park S, Moon EY. Spleen tyrosine kinase regulates crosstalk of hypoxia-inducible factor-1 α and nuclear factor (erythroid-derived2)-like 2 for B cell survival. *International Immunopharmacology* 95. Published online 2021:107509. doi:10.1016/j.intimp.2021.107509
65. Sahan-Firat S, Temiz-Resitoglu M, Guden DS, et al. NF- κ B activation mediates LPS-or zymosan-induced hypotension and inflammation reversed by BAY61-3606, a selective Syk inhibitor, in rat models of septic and non-septic shock. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2019;46(2):173-182. doi:10.1111/1440-1681.13045/FORMAT/PDF
66. Zheng TJ, Lofurno ER, Melrose AR, et al. Assessment of the effects of Syk and BTK inhibitors on GPVI-mediated platelet signaling and function. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00296.2020>. 2021;320(5):C902-C915. doi:10.1152/AJPCELL.00296.2020
67. Saci A, Liu WQ, Vidal M, Garbay C, Rendu F, Bachelot-Loza C. Differential effect of the inhibition of Grb2-SH3 interactions in platelet activation induced by thrombin and by Fc receptor engagement. *Biochemical Journal.* 2002;363(3):717-725. doi:10.1042/0264-6021:3630717
68. Torres-Gomez A, Cabañas C, Lafuente EM. Phagocytic Integrins: Activation and Signaling. *Front Immunol.* 2020;11:738. doi:10.3389/fimmu.2020.00738
69. Mendoza-Coronel E, Ortega E. Macrophage polarization modulates Fc γ R- and CD13-mediated phagocytosis and reactive oxygen species production, independently of receptor membrane expression. *Front Immunol.* 2017;8(MAR):303. doi:10.3389/fimmu.2017.00303
70. Kühlmann UC, Chwieralski CE, van den Brule S, et al. Modulation of cytokine production and silica-induced lung fibrosis by inhibitors of aminopeptidase N and of dipeptidyl peptidase-IV-related proteases. *Life Sci.* 2009;84(1-2):1-11. doi:10.1016/J.LFS.2008.10.001
71. Kehlen A, Göhring B, Langner J, Riemann D. Regulation of the expression of aminopeptidase A, aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 in renal carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by cytokines and cAMP-increasing mediators. *Clin Exp Immunol.* 2001;111(2):435-441. doi:10.1046/J.1365-2249.1998.00513.X
72. Gabrilovac J, Breljak D, Čupić B. Regulation of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2; APN; CD13) on the HL-60 cell line by TGF- $\beta 1$. *Int Immunopharmacol.* 2008;8(5):613-623. doi:10.1016/J.INTIMP.2007.12.016
73. Gabrilovac J, Čupić B, Živković E, Horvat L, Majhen D. Expression, regulation and functional activities of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2; APN; CD13) on murine macrophage J774 cell line. *Immunobiology.* 2011;216(1-2):132-144. doi:10.1016/j.imbio.2010.06.005

74. Shabir K, Gharanei S, Orton S, et al. Asprosin Exerts Pro-Inflammatory Effects in THP-1 Macrophages Mediated via the Toll-like Receptor 4 (TLR4) Pathway. *Int J Mol Sci.* 2022;24(1):227. doi:10.3390/IJMS24010227/S1
75. Souissi C, Marzouki S, Elbini-Dhouib I, et al. PpSP32, the Phlebotomus papatasi immunodominant salivary protein, exerts immunomodulatory effects on human monocytes, macrophages, and lymphocytes. *Parasit Vectors.* 2023;16(1):1-12. doi:10.1186/S13071-022-05627-7/FIGURES/5
76. Zhou J, Fang F, Qi J, et al. Activation of Nrf2 modulates protective immunity against Mycobacterium tuberculosis infection in THPI-derived macrophages. *Free Radic Biol Med.* 2022;193:177-189. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2022.10.274
77. Lee AJ, Ashkar AA. The dual nature of type I and type II interferons. *Front Immunol.* 2018;9(SEP):2061. doi:10.3389/FIMMU.2018.02061/BIBTEX
78. Gredmark S, Britt WB, Xie X, Lindbom L, Söderberg-Nauclér C. Human Cytomegalovirus Induces Inhibition of Macrophage Differentiation by Binding to Human Aminopeptidase N/CD13. *The Journal of Immunology.* 2004;173(8):4897-4907. doi:10.4049/JIMMUNOL.173.8.4897
79. Yeager C, Ashmun R, Williams R, et al. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature.* 1992;357(6377):420-422. doi:10.1038/357420A0
80. Yamaya M, Nishimura H, Deng X, et al. Inhibitory effects of glycopyrronium, formoterol, and budesonide on coronavirus HCoV-229E replication and cytokine production by primary cultures of human nasal and tracheal epithelial cells. *Respir Investig.* 2020;58(3):155-168. doi:10.1016/J.RESINV.2019.12.005
81. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* 2003 3:2. 2003;3(2):133-146. doi:10.1038/nri1001
82. Teng MWL, Bowman EP, McElwee JJ, et al. IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nature Medicine* 2015 21:7. 2015;21(7):719-729. doi:10.1038/nm.3895
83. Vignali DAA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature Immunology* 2012 13:8. 2012;13(8):722-728. doi:10.1038/ni.2366
84. Lamers C, Plüss CJ, Ricklin D. The Promiscuous Profile of Complement Receptor 3 in Ligand Binding, Immune Modulation, and Pathophysiology. *Front Immunol.* 2021;12:1483. doi:10.3389/FIMMU.2021.662164/BIBTEX
85. Munawara U, Small AG, Quach A, Gorgani NN, Abbott CA, Ferrante A. Cytokines regulate complement receptor immunoglobulin expression and phagocytosis of Candida albicans in human macrophages: A control point in anti-microbial immunity. *Sci Rep.* 2017;7(1). doi:10.1038/S41598-017-04325-0
86. Cross CE, Collins HL, Bancroft GJ. CR3-dependent phagocytosis by murine macrophages: different cytokines regulate ingestion of a defined CR3 ligand and complement-opsonized Cryptococcus neoformans. *Immunology.* 1997;91(2):289-296. doi:10.1046/J.1365-2567.1997.00238.X
87. Ehlers MRW. CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect.* 2000;2(3):289-294. doi:10.1016/S1286-4579(00)00299-9
88. Mina-Osorio P, Soto-Cruz I, Ortega E. A role for galectin-3 in CD13-mediated homotypic aggregation of monocytes. Published online 2006. doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.081
89. Fiddler CA, Parfrey H, Cowburn AS, et al. The aminopeptidase CD13 induces homotypic aggregation in neutrophils and impairs collagen invasion. *PLoS One.* 2016;11(7). doi:10.1371/journal.pone.0160108
90. Kido A, Krueger S, Haeckel C, Roessner A. Inhibitory effect of antisense aminopeptidase N (APN/CD13) cDNA transfection on the invasive potential of osteosarcoma cells. *Clin Exp Metastasis.* 2003;20(7):585-592. doi:10.1023/A:1027383729767
91. Berthold T, Glaubitz M, Muschter S, et al. Human neutrophil antigen-3a antibodies induce neutrophil stiffening and conformational activation of CD11b without shedding of L-selectin. *Transfusion (Paris).* 2015;55(12):2939-2948. doi:10.1111/trf.13299
92. Li N, Yang H, Wang M, Lü S, Zhang Y, Long M. Ligand-specific binding forces of LFA-1 and Mac-1 in neutrophil adhesion and crawling. *Mol Biol Cell.* 2018;29(4):408-418. doi:10.1091/mbc.E16-12-0827
93. Schwartz JT, Barker JH, Long ME, Kaufman J, McCracken J, Allen LAH. Natural IgM Mediates Complement-Dependent Uptake of Francisella tularensis by Human Neutrophils via Complement Receptors 1 and 3 in Nonimmune Serum. *The Journal of Immunology.* 2012;189(6):3064-3077. doi:10.4049/jimmunol.1200816
94. Gonzalez AC, Barriaes D, Palacios A, et al. Regulation of macrophage activity by surface receptors contained within Borrelia burgdorferi-enriched phagosomal fractions. *PLoS Pathog.* 2019;15(11). doi:10.1371/journal.ppat.1008163
95. Vachon E, Martin R, Kwok V, et al. CD44-mediated phagocytosis induces inside-out activation of complement receptor-3 in murine macrophages. *Blood.* 2007;110(13):4492-4502. doi:10.1182/blood-2007-02-076539
96. Tokuhara T, Hattori N, Ishida H, et al. Clinical Significance of Aminopeptidase N in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2006;12(13):3971-3978. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0338
97. Piedfer M, Dauzonne D, Tang R, N'Guyen J, Billard C, Bauvois B. Aminopeptidase-N/CD13 is a potential proapoptotic target in human myeloid tumor cells. *The FASEB Journal.* 2011;25(8):2831. doi:10.1096/FJ.11-181396

98. Hashida H, Takabayashi A, Kanai M, et al. Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology*. 2002;122(2):376-386. doi:10.1053/GAST.2002.31095
99. Mishima Y, Terui Y, Sugimura N, et al. Continuous treatment of bestatin induces anti-angiogenic property in endothelial cells. *Cancer Sci*. 2007;98(3):364-372. doi:10.1111/J.1349-7006.2007.00393.X
100. Mishima Y, Matsumoto-Mishima Y, Terui Y, et al. Leukemic Cell-Surface CD13/Aminopeptidase N and Resistance to Apoptosis Mediated by Endothelial Cells. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2002;94(13):1020-1028. doi:10.1093/JNCI/94.13.1020
101. Fernandes RA, Su L, Nishiga Y, et al. Immune receptor inhibition through enforced phosphatase recruitment. *Nature*. 2020;586(7831):779-784. doi:10.1038/s41586-020-2851-2
102. Zeke A, Misheva M, Reményi A, Bogoyevitch MA. JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2016;80(3):793-835. doi:10.1128/membr.00043-14
103. Meier TI, Cook JA, Thomas JE, et al. Cloning, expression, purification, and characterization of the human Class Ia phosphoinositide 3-kinase isoforms. *Protein Expr Purif*. 2004;35(2):218-224. doi:10.1016/j.pep.2003.12.010
104. Guyot B, Mouchiroud G. Characterization of promoter elements directing Mona/Gads molecular adapter expression in T and myelomonocytic cells: involvement of the AML-1 transcription factor. *J Leukoc Biol*. 2003;73(2):263-272. doi:10.1189/jlb.0502244
105. Oda A, Ochs HD, Lasky LA, et al. CrkL is an adapter for Wiskott-Aldrich syndrome protein and Syk. *Blood*. 2001;97(9):2633-2639. doi:10.1182/blood.V97.9.2633
106. Shi X, Pan S, Li Y, et al. Xanthoplanine attenuates macrophage polarization towards M1 and inflammation response via disruption of CrkL-STAT5 complex. *Arch Biochem Biophys*. 2020;683. doi:10.1016/j.abb.2020.108325
107. Mhrshahi R, Brown MH. Downstream of Tyrosine Kinase 1 and 2 Play Opposing Roles in CD200 Receptor Signaling. *The Journal of Immunology*. 2010;185(12):7216-7222. doi:10.4049/jimmunol.1002858
108. Plataniias LC, Uddin S, Bruno E, et al. CrkL and CrkII participate in the generation of the growth inhibitory effects of interferons on primary hematopoietic progenitors. *Exp Hematol*. 1999;27(8):1315-1321. doi:10.1016/S0301-472X(99)00060-0
109. Kataoka TR, Kumanogoh A, Bandara G, Metcalfe DD, Gilfillan AM. CD72 Negatively Regulates KIT-Mediated Responses in Human Mast Cells. *The Journal of Immunology*. 2010;184(5):2468-2475. doi:10.4049/jimmunol.0902450
110. Cui Y, Zhou F, Bai H, et al. Real-time QCM-D monitoring of endothelial cells and macrophages adhering and spreading to SEMA4D/heparin surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018;171:522-529. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.07.062
111. Galuppo MK, de Rezende E, Forti FL, et al. CD100/Sema4D increases macrophage infection by *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in a CD72 dependent manner. *Front Microbiol*. 2018;9(JUN):1177. doi:10.3389/fmicb.2018.01177
112. Irizarry-Caro RA, McDaniel MM, Overcast GR, Jain VG, Troutman TD, Pasare C. TLR signaling adapter BCAP regulates inflammatory to reparatory macrophage transition by promoting histone lactylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(48):30628-30638. doi:10.1073/pnas.2009778117
113. Miao Y, Jiang M, Qi L, Yang D, Xiao W, Fang F. BCAP Regulates Dendritic Cell Maturation Through the Dual-Regulation of NF- κ B and PI3K/AKT Signaling During Infection. *Front Immunol*. 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.00250
114. Troutman TD, Hu W, Fulechek S, et al. Role for B-cell adapter for PI3K (BCAP) as a signaling adapter linking Toll-like receptors (TLRs) to serine/threonine kinases PI3K/Akt. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(1):273-278. doi:10.1073/pnas.1118579109
115. Lőrincz ÁM, Szeifert V, Bartos B, Szombath D, Mócsai A, Ligeti E. Different Calcium and Src Family Kinase Signaling in Mac-1 Dependent Phagocytosis and Extracellular Vesicle Generation. *Front Immunol*. 2019;10:2942. doi:10.3389/fimmu.2019.02942
116. Hedl M, Sun R, Huang C, Abraham C. STAT3 and STAT5 Signaling Thresholds Determine Distinct Regulation for Innate Receptor-Induced Inflammatory Cytokines, and STAT3 / STAT5 Disease Variants Modulate These Outcomes. *The Journal of Immunology*. 2019;203(12):3325-3338. doi:10.4049/jimmunol.1900031
117. de Nichilo MO, Burns GF. Granulocyte-macrophage and macrophage colony-stimulating factors differentially regulate α v integrin expression on cultured human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(6):2517-2521. doi:10.1073/pnas.90.6.2517
118. Rao SP, Ogata K, Catanzaro A. Mycobacterium avium-M. intracellulare binds to the integrin receptor α v beta 3 on human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect Immun*. 1993;61(2).
119. Escate R, Padro T, Badimon L. LDL accelerates monocyte to macrophage differentiation: Effects on adhesion and anoikis. *Atherosclerosis*. 2016;246:177-186. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.01.002

120. Kurita-Taniguchi M, Hazeki K, Murabayashi N, et al. Molecular assembly of CD46 with CD9, alpha3-beta1 integrin and protein tyrosine phosphatase SHP-1 in human macrophages through differentiation by GM-CSF. *Mol Immunol*. 2002;38(9):689-700. doi:10.1016/S0161-5890(01)00100-6
121. Ben-Horin S, Bank I. The role of very late antigen-1 in immune-mediated inflammation. *Clinical Immunology*. 2004;113(2):119-129. doi:10.1016/j.clim.2004.06.007
122. Martrus G, Goebels H, Langeneckert AE, et al. CD49a expression identifies a subset of intrahepatic macrophages in humans. *Front Immunol*. 2019;10(JUN):1247. doi:10.3389/fimmu.2019.01247
123. Puolakkainen P, Koski A, Vainionpää S, et al. Anti-inflammatory macrophages activate invasion in pancreatic adenocarcinoma by increasing the MMP9 and ADAM8 expression. *Medical Oncology*. 2014;31(3):1-9. doi:10.1007/s12032-014-0884-9
124. Ainola M, Li TF, Mandelin J, et al. Involvement of a disintegrin and a metalloproteinase 8 (ADAM8) in osteoclastogenesis and pathological bone destruction. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(3):427-434. doi:10.1136/ard.2008.088260
125. Chung J, Serezani CH, Huang SK, et al. Rap1 Activation Is Required for Fcγ Receptor-Dependent Phagocytosis. *The Journal of Immunology*. 2008;181(8):5501-5509. doi:10.4049/jimmunol.181.8.5501
126. Hilbi H, Kortholt A. Role of the small GTPase Rap1 in signal transduction, cell dynamics and bacterial infection. *Small GTPases*. 2019;10(5):336-342. doi:10.1080/21541248.2017.1331721
127. Hyduk SJ, Rullo J, Cano AP, et al. Talin-1 and Kindlin-3 Regulate $\alpha 4 \beta 1$ Integrin-Mediated Adhesion Stabilization, but Not G Protein-Coupled Receptor-Induced Affinity Upregulation. *The Journal of Immunology*. 2011;187(8):4360-4368. doi:10.4049/jimmunol.1003725
128. Lim J, Thompson J, May RC, Hotchin NA, Caron E. Regulator of G-Protein Signalling-14 (RGS14) Regulates the Activation of $\alpha M \beta 2$ Integrin during Phagocytosis. *PLoS One*. 2013;8(6). doi:10.1371/journal.pone.0069163
129. Senetar MA, McCann RO. Gene duplication and functional divergence during evolution of the cytoskeletal linker protein talin. *Gene*. 2005;362(1-2):141-152. doi:10.1016/j.gene.2005.08.012
130. Guet R, Vefollets C, Lamsoul I, et al. Macrophage mesenchymal migration requires podosome stabilization by filamin A. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(16):13051-13062. doi:10.1074/jbc.M111.307124

10. ANEXOS

- I. **TABLA A. Descripción de las 76 proteínas que conforman la red de interacciones de CD13, CR3 (CD11b/CD18) y Syk.** Se enlista cada uno de los nodos de la red de interacciones (Figura 3), su número de la Comisión de Enzimas (EC) si es que tiene uno asignado, otros nombres por los que se conoce a la molécula, algunos ejemplos de sus funciones, especialmente los relevantes para su elección como parte de la red, la molécula con la que se interrogó a la base de datos STRING y la puntuación de interacción combinada que justificó su selección. Los datos fueron obtenidos de la base de datos The Gene Cards, excepto en los casos donde está indicada otra referencia.

Nodo	Número EC	Otros nombres por los que se conoce	Ejemplos de funciones	Interacción por la que se incluyó en la red (Nodo de interrogación)	Puntuación de interacción combinada
ANPEP	3.4.11.2	<ul style="list-style-type: none"> • CD13 • Aminopeptidasa N • Alanil aminopeptidasa de membrana • Gp150 	<ul style="list-style-type: none"> • Receptor fagocítico²⁶ • Receptor de adhesión²¹ • Marcador de linaje mielomonocítico²¹ • Procesamiento de péptidos (hormonas, quimiocinas y neuropéptidos) • Receptor viral (HCoV-229E, HCMV) 	NA – Nodo de interrogación	NA
SYK	2.7.10.2	p72-Syk	<ul style="list-style-type: none"> • Tirosina cinasa no receptora • Regulación de inmunidad innata y adaptativa, adhesión celular, maduración de osteoclastos, activación de plaquetas, desarrollo vascular, etc. 	NA – Nodo de interrogación	NA
ITGAM	NA	<ul style="list-style-type: none"> • CD11b • Subunidad α de CR3 • Integrina αM • Mac-1A • p170 		Nodo de interrogación / CD18	NA / 0.992
ITGB2	NA	<ul style="list-style-type: none"> • CD18 • Subunidad β de CR3 y CR4 • Integrina β2 • Subunidad β de Mac-1 • p95 	<ul style="list-style-type: none"> • Receptor fagocítico • Receptor de adhesión en leucocitos • Regula migración de neutrófilos 	Nodo de interrogación / CD11b	NA / 0.992
GRB2	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína 2 de unión al receptor de factor de crecimiento • ASH • NCKAP2 	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína adaptadora que provee un vínculo crítico entre receptores de superficie celular para factor de crecimiento y la vía de señalización de Ras • Proteína principal asociada a CBL 	CD13 / Syk	NA / 0.982
SOS1	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Homólogo 1 de “Son of Sevenless” • Factor de intercambio de nucleótidos de guanina 1 • GF1 • HGF 	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve el intercambio de GDP unido a Ras por GTP • Probablemente promueve la activación de Ras, regula la fosforilación de ERK1 en respuesta al factor de crecimiento epidérmico • 	CD13	NA
			<ul style="list-style-type: none"> • Puede servir como una proteína de andamiaje para la organización de un complejo multimolecular que estaría en la 		

IQGAP1	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína 1 activadora de GTPasa con motivos IQ • p195 • HUMORFA01 • SAR1 • KIAA0051 	<p>interface de las señales que lleguen a la célula para la reorganización del citoesqueleto de actina en la membrana plasmática</p> <ul style="list-style-type: none"> • Juega un papel crucial en la regulación de la dinámica y en ensamblaje del citoesqueleto de actina • Se une a CDC24 activada pero no estimula su actividad de GTPasa • Se asocia con Calmodulina 	CD13	NA
PTPRC	3.1.3.48	<ul style="list-style-type: none"> • Receptor tirosina fosfatasa de proteínas tipo C • T200 • Gp180 • CD45 • LCA 	<ul style="list-style-type: none"> • Receptor promiscuo de superficie celular que desfosforila tirosinas en motivos ITAM, ITIM o ITSM en otros receptores, regulando su actividad. Por ejemplo, es capaz de inhibir de la señal anti-fagocítica de SIRPA en macrófagos y potenciar su fagocitosis dependiente de anticuerpos⁷³ 	CD11b / CD13	0.97 / 0.814
CD33	NA	<ul style="list-style-type: none"> • SIGLEC-3 • Gp67 • p67 	<ul style="list-style-type: none"> • Unión a glucanos que contienen ácido siálico • Participa en interacciones célula-célula y en mantener a las células inmunes en un estado no activado • Regula cascadas de señalización vía fosfatasas SHP-1 y SHP-2 	CD13 / CD11b	0.922 / 0.981
CD34	NA	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Posible molécula de adhesión durante la hematopoyesis • Puede actuar como andamiaje para permitir a las células madre anclarse a componentes de la médula ósea • Presenta ligandos (carbohidratos) a selectinas • Marcador de células progenitoras hematopoyéticas 	CD13	0.867
ITGA6	NA	<ul style="list-style-type: none"> • CD49f • Integrina α6 • Integrina α6b • VLA-6 	<ul style="list-style-type: none"> • En complejo con la integrina β1 se une a NRG1 y es esencial para la señalización de NGR1-ERBB • Adhesión célula-célula y célula-ECM 	CD13	0.944
JNK74	2.7.11.24	<ul style="list-style-type: none"> • JNK1: MAPK8, SAPK, JNK-46, PRKM8 • JNK2: MAPK9, SAPK1a, JNK-55, PRKM9 	<ul style="list-style-type: none"> • Las JNKs (quinasas de N-terminal de c-Jun) son un grupo de quinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPKs) • Quinasas de serina/treonina no receptoras • Enzimas efectoras de vías de señalización inducidas por receptores para: hormonas, neurotransmisores, factores morfogénicos, citocinas inflamatorias, patógenos intracelulares y extracelulares. 	CD13	NA

		<ul style="list-style-type: none"> JNK3: MAPK10, SAPK1b, PRKM10 	<ul style="list-style-type: none"> Participan en vías de señalización activadas por estímulos intracelulares como estrés oxidativo y daño al ADN 		
p38	2.7.11.24	<ul style="list-style-type: none"> MAPK11: SAPK2, p38-2, PRKM11 MAPK12: ERK-6, SAPK3, p38γ, PRKM12 MAPK13: SAPK4, p38δ, PRKM13, MAPK14: p38α, PRKM14/15, SAPK2a 	<ul style="list-style-type: none"> Cinasa de serina/treonina no receptora Se han reportado cuatro isoformas de esta proteína, éstas son producidas por transcritos resultantes de empalme alternativo Cinasa activada por varios estímulos de estrés ambiental y citocinas proinflamatorias Su activación requiere de fosforilación por cinasas de cinasas MAP (MAPKKs) o de su autofosforilación inducida por la interacción con la proteína MAP3K71P1/TAB1 Sus sustratos incluyen reguladores de la transcripción (ATF2, MEF2C y MAX), el regulador del ciclo celular CDC25B y el supresor de tumores p53, lo cual sugiere que estas cinasas tienen un papel en la transcripción relacionada al estrés y a la regulación del ciclo celular, así como en la respuesta al estrés genotóxico. 	CD13	NA
SRC	2.7.10.2	<ul style="list-style-type: none"> p60-SRC SRC1 ASV 	<ul style="list-style-type: none"> Tirosina cinasa de proteínas no receptora que es activada luego de la estimulación de una gran diversidad de receptores celulares, incluyendo de respuesta inmune, integrinas y otros receptores de adhesión, tirosina cinasas de proteínas receptoras, receptores acoplados a proteínas G y receptores de citoquinas Participa en las vías de señalización que controlan un amplio espectro de actividades biológicas, incluyendo transcripción génica, respuesta inmune, adhesión celular, progresión del ciclo celular, apoptosis, migración y transformación El agrupamiento o la dimerización de receptores tiene como consecuencia el reclutamiento de Src a estos complejos, en donde fosforila los residuos de tirosina de los dominios citoplásmicos de los receptores 	CD13	NA
FAK	2.7.10.2	<ul style="list-style-type: none"> Tirosina cinasa de proteínas 2 PTK2 Cinasa de adhesión focal 1 	<ul style="list-style-type: none"> Tirosina cinasa de proteínas no receptora Juega un papel esencial en migración celular, adhesión, extensión, reorganización del citoesqueleto de actina, formación y desensamble de adhesiones focales y protrusiones celulares, progresión del ciclo celular, proliferación celular y apoptosis. Participa en la señalización intracelular de integrinas 	CD13	NA

ERK 1/2	2.7.11.24	<ul style="list-style-type: none"> • ERK1: MAPK3, PRKM3, P44-MAPK, • ERK2: MAPK1, PRMK1, P42-MAPk 	<ul style="list-style-type: none"> • MAP cinasas también conocidas como cinasas reguladas por señales extracelulares • Se han reportado dos variantes de empalme alternativo para este gen, las cuales difieren en sus regiones no traducidas • Su activación requiere la fosforilación por cinasas río arriba • Actúan como un punto de integración de múltiples señales bioquímicas, y están involucradas en una amplia variedad de procesos celulares como proliferación, diferenciación, regulación de la transcripción y desarrollo. • Luego de su activación, esta cinasa se transloca al núcleo de las células estimuladas, donde fosforila blancos nucleares. También se ha sugerido que actúa como represor transcripcional independientemente de su actividad como cinasa. • Se considera una proteína multifuncional 	CD13	NA
PKC	2.7.11.13	<ul style="list-style-type: none"> • PKCA: PKCα, PRKACA • PKCB: PKCB1/2, PKCβ, PRKCB1/2 • PKCG: PKCγ, PKCC, PRKCG 	<ul style="list-style-type: none"> • PKCs clásicas o convencionales • Cinasas de proteína en serina/treonina, activadas por Ca²⁺ y dependientes de diacilglicerol • Fosforila directamente blancos como RAF1, BCL2, CSPG4, TNNT2/CTNT y activa cascadas de señalización que involucran a ERK 1/2 y RAP1GAP • Por lo anterior, las PKCs clásicas están involucradas en la regulación positiva y negativa de la proliferación celular, apoptosis, diferenciación, migración, adhesión, tumorigénesis, hipertrofia cardiaca, angiogénesis, función plaquetaria e inflamación 	CD13	NA
MEK-1	2.7.12.2	<ul style="list-style-type: none"> • MAPKK1 • Cinasa 1 de MAPK/ERK • Cinasa 1 activadora de ERK • PRKMK1 	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína de especificidad dual (tirosina/treonina) que actúa como componente esencial de la vía de MAPK. • Cuando se activan receptores para ligandos extracelulares como factores de crecimiento, citocinas y hormonas, se activa RAS, luego RAF1 y ésta activa a las cinasas MEK1 y MEK2 • MEK1 y 2 funcionan específicamente en la cascada MAPK/ERK y catalizan la fosforilación de residuos localizados en ERK1 y ERK2 	CD13	NA
			<ul style="list-style-type: none"> • Existen cuatro PI3Ks Clase I en mamíferos (α, β, δ, and γ) que están cercanamente relacionadas por homología de secuencia en el dominio catalítico y en la generación 		

PI3K	2.7.1.137	<ul style="list-style-type: none"> • Cinasa de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3 	<p>preferencial de PIP₃ a a partir de PIP₂ y ATP75</p> <ul style="list-style-type: none"> • Está involucrada en respuestas inmunes inflamatorias y alérgicas • Modula la quimiotaxis a sitios de inflamación y en respuesta a agentes quimioatrayentes • Puede controlar la polarización y migración de leucocitos mediante la regulación de la acumulación espacial de PIP₃, y regulando la organización de la formación de F-actina y de la adhesión basada en integrinas en el borde de avance • PIK3γ (PIKCG) y PIK3δ (PIKCD) participan en el estallido respiratorio, quimiotaxis y extravasación de neutrófilos • PIK3γ (PIKCG) y PIK3β (PIKCB) promueven la agregación plaquetaria y la trombosis • PIK3γ (PIKCG) regula la la función adhesiva de las integrinas αIIb/β3 (ITGA2B/ITGB3) en plaquetas, a través de un mecanismo dependiente de actividad de cinasa de lípidos río debajo de P2Y12 	CD13	NA
GAB2	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína de unión 2 asociada a Grb2 • Pp100 • KIAA0571 	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína adaptadora y reguladora que actúa río debajo de varios receptores de membrana, incluyendo aquellos para citocinas, antígenos, hormonas, ECM y factor de crecimiento. • Juega un papel en la activación y desgranulación de mastocitos a través de la regulación de la cinasa de PI3 durante la respuesta alérgica. • Está involucrada en la regulación de la proliferación celular y hematopoyesis 	Syk	0.970
GRAP2	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína adaptadora 2 relacionada a Grb2 • Proteína adaptadora GRID • Grf-40 • Mona • GADS 	<ul style="list-style-type: none"> • Adaptador molecular implicado en la activación de células T y la diferenciación de macrófagos⁷⁶ 	Syk	0.977
CRKL	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Protoncogene parecido a CRK 	<ul style="list-style-type: none"> • Molecula adaptadora que se asocia con proteínas como WASP, paxilina, Stat-5 y Syk en plaquetas¹⁰⁵ • Participa en complejo con Stat-5, en la polarización de macrófagos M1 y en la respuesta inflamatoria⁷⁷ • Es parte de la vía de señalización del receptor de regulación negativa de células mieloides CD200⁷⁸ • Participa en la señalización que media la inhibición de la proliferación regulada por interferón en células hematopoyéticas⁷⁹ 	Syk	0.981

NCK1	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína adaptadora NCK 1 • Proteína adaptadora SH2/SH3 NCK-α 	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína adaptadora que se asocia con receptores fosforilados de factores de crecimiento como KDR y PDGFRB • Puede tener un papel en la migración y adhesión celular a través de la interacción con receptores de efrina • Participa en la respuesta de daño al ADN 	Syk	0.967
PTPN6	3.1.3.48	<ul style="list-style-type: none"> • SHP-1 • Tirosina fosfatasa de proteínas no receptora tipo 6 • Tirosina fosfatasa de proteínas de células hematopoyéticas • HCP • PTP1C 	<ul style="list-style-type: none"> • Modula la señalización de receptores de superficie celular fosforilados en tirosina, como KIT y EGFR • Las regiones SH2 podrían interactuar con otros componentes celulares para modular su propia actividad de fosfatasa en contra de los sustratos con los que interactúe • Juega un papel en la hematopoyesis 	Syk	0.986
TYROBP	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína de unión a cinasas de tirosina • DAP12 • KARAP • PLOSL1 	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína adaptadora que se asocia con receptores estimulados por ligando (e.g. CD300) en células mieloides y NK, y transduce señales a través de su dominio ITAM • Se asocia con SIRPB1 para mediar la activación de células mieloides (monocitos y DCs) • Se asocia con TREM1 para mediar la activación de neutrófilos y monocitos 	Syk	0.988
CD72	NA	LYB2	<ul style="list-style-type: none"> • Al ser estimulado, regula negativamente las respuestas de crecimiento, diferenciación y supervivencia mediadas por el receptor KIT de mastocitos humanos80 • Media la adhesión y extensión de macrófagos murinos a través de su interacción con SEMA4D/CD100 soluble81 • CD100 soluble aumenta la infección y fagocitosis de promastigotes de <i>Leishmania amazonensis</i> en macrófagos murinos, de manera dependiente de CD7282 	Syk	0.966
CBL	2.3.2.27	<ul style="list-style-type: none"> • Ubiquitina-proteína ligasa E3 • Protoncogene Casitas de linaje de células B • CBL2 	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína adaptadora que funciona como regulador negativo de varias vías de señalización inducidas por la activación de receptores de superficie • Reconoce tirosinas cinasas receptoras como KIT, FLT1, FGFR1, FGFR2, PDGFRA, PDGFRB, CSF1R, EPHA8 y KDR, y finaliza su señalización • Participa en la transducción de señales en células hematopoyéticas 	Syk	0.993
CBLB	2.3.2.27	<ul style="list-style-type: none"> • Protoncogene B de CBL • Protoncogene B Casitas de linaje de células B 	<ul style="list-style-type: none"> • Ubiquitinación de sustratos, generalmente promoviendo su degradación por proteasoma • Regula negativamente las vías de señalización de los TCR, BCR y FCER1 	Syk	0.986

		<ul style="list-style-type: none"> Ubiquitina-proteína ligasa E3 CBL-B 	<ul style="list-style-type: none"> Posiblemente involucrado en la ubiquitinación e internalización de EGFR 		
PIK3R1	NA	<ul style="list-style-type: none"> Subunidad reguladora 1 de PI3K GRB1 Subunidad p85α de PI3K p85-α IMD36 	<ul style="list-style-type: none"> Está involucrada en la señalización en respuesta a la estimulación de ITGB2 (CD18), FGFR1, 2, 3 y 4, KITLG/SCF, KIT, PDGFRA y PDGFRB. Se une a tirosina cinasas de proteínas activadas (fosforiladas) a través de su dominio SH2, y actúa como una adaptadora, mediando la asociación de la subunidad catalítica p110 a la membrana plasmática 	Syk	0.957
PIK3AP1	NA	<ul style="list-style-type: none"> Proteína adaptadora 1 de PI3K Proteína adaptadora 1 de PI3K de células B Proteína adaptadora de células B BCAP FLJ35563 	<ul style="list-style-type: none"> Regula la transición de macrófagos de su estado proinflamatorio a uno de reparación⁸³ Regula la maduración de células dendríticas durante la infección a través de la regulación de la señalización de PI3K/AKT y NF-κB84 Participa en la señalización de TLRs vinculándolos con PI3K/AKT Se requiere para proteger a los macrófagos de la apoptosis inducida por el estrés del retículo endoplásmico⁸⁵ 	Syk	0.971
PLCG2	3.1.4.11	<ul style="list-style-type: none"> PLCγ2 Fosfolipasa Gamma 2 1-fosfatidilinositol 4,5-bifosfato fosfodiesterasa Gamma-2 PLC-IV APLAID FCAS3 	<ul style="list-style-type: none"> Las enzimas PLC específicas para fosfatidilinositol activadas median la producción de segundo mensajero diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) Es crucial para la señalización transmembranal Tiene un papel esencial en la formación de vesículas extracelulares antibacteriales mediada por la estimulación de CR3 (CD11b/CD18)⁸⁶ 	Syk	0.991
LYN	2.7.10.2	<ul style="list-style-type: none"> Nueva tirosina cinasa de proteínas relacionada a Lck/Yes p53Lyn p56Lyn 	<ul style="list-style-type: none"> Tirosina cinasa de proteínas no receptora que transmite señales desde los receptores de superficie células y juega un papel importante en la regulación de las respuestas inmunes innata y adaptativa, hematopoyesis, respuestas a los factores de crecimiento y citocinas Participa en las respuestas de daño al DNA y agentes genotóxicos Funciona principalmente como reguladora negativa, pero puede actuar también como activadora, dependiendo del contexto. Juega un papel importante en la regulación de la diferenciación de las células B, diferenciación, proliferación, supervivencia y apoptosis, y también es importante para la tolerancia inmunológica a antígenos propios 	Syk	0.966

			<ul style="list-style-type: none"> • Actúa río debajo de varios receptores inmunes, incluyendo BCR, CD79A, CD79B, CD5, CD19, CD22, FCER1, FCGR2, FCGR1A, TLR2 y TLR4 		
FGR	2.7.10.2	<ul style="list-style-type: none"> • Homólogo del oncogene viral felino de sarcoma Gardner-Rasheed • Src2 • p55Fgr • p58Fgr 	<ul style="list-style-type: none"> • Tirosina cinasa de proteínas no receptora que transmite señales desde receptores de superficie celular sin actividad de cinasa y contribuye a la regulación de las respuestas inmunes, incluyendo funciones de neutrófilos, monocitos, macrófagos y mastocitos, remodelación del citoesqueleto en respuesta a estímulos extracelulares, fagocitosis, adhesión celular y migración • Actúa río debajo de ITGB1 (CD29) e ITGB2 (CD18), y regula la reorganización del citoesqueleto de actina, el anclaje y la adhesión celular. Dependiendo del contexto activa o inhibe las respuestas celulares • Funciona como un regulador negativo de la señalización de ITGB2, fagocitosis y la actividad de Syk en monocitos • Se requiere para la señalización estándar de ITGB1 e ITGB2, anclaje y adhesión no patológicos en neutrófilos y macrófagos • Promueve la fosforilación de CBL, CTTN, PIK3R1, PTK2/FAK1, PTK2B/PYK2 y VAV2 	Syk	0.964
BTK	2.7.10.2	<ul style="list-style-type: none"> • Tirosina cinasa de Bruton • Cinasa de progenitores de células B • BPK • Tirosina cinasa de agamaglobulinemia • ATK • AGMX1 • PSCTK1 	<ul style="list-style-type: none"> • Tirosina cinasa no receptora indispensable para el desarrollo, diferenciación y señalización en linfocitos B • Juega un papel importante en la función de las células de la inmunidad innata y adaptativa, como componente de las vías de señalización de los TLRs • BTK es crítica para la regulación de la transcripción, vincula a estimulación de TLR8 y 9 con NF-κB, el cual está involucrado en la regulación de la transcripción de cientos de genes 	Syk	0.964
CLEC4E	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Miembro E de la Familia 4 del Dominio Tipo C de Lectina • Lectina tipo C Inducible por Macrófagos • Miembro 9 de la Superfamilia de Lectina Tipo C (Dominio de Reconocimiento de Carbohidratos) 	<ul style="list-style-type: none"> • Lectina dependiente de calcio que actúa como receptor de reconocimiento de patrones del sistema (PRRs) inmunológico innato. Reconoce patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) provenientes de moléculas anormales del hospedero y de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de bacterias y hongos • Interactúa con el adaptador de señalización, cadena gamma del receptor Fc (FCER1G) para formar un complejo funcional en células mieloides. La unión del componente micobacteriano TDM a este complejo de 	Syk	0.970

		<p>Dependiente de Calcio)</p> <ul style="list-style-type: none"> • CLECSF9 • MINCLE 	<p>receptores resulta en la fosforilación del ITAM de FCER1G, induciendo la activación de Syk, CARD9 y NK-κB, llevando consecuentemente a la maduración de células presentadoras de antígeno y modelando la estimulación antígeno-específica de células T hacia los subtipos efectores Th1 y Th17</p>		
CLEC7A	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Miembro A de la familia 7 del Dominio de Lectina tipo C • Dectina-1 • CLECSF12 • SCARE2 • CD369 • BGR • Lectina-1 tipo C asociada a Células Dendríticas • CANDF4 	<ul style="list-style-type: none"> • Necesaria para la respuesta inflamatoria mediada por TLR2 y para la activación de NK-κB mediada por TLR2 • Aumenta la producción de citocinas en macrófagos y células dendríticas • Media la producción de ROS • Media la fagocitosis de conidios de <i>Candida albicans</i> 	Syk	0.988
CLEC6A	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Miembro A de la Familia 6 del Dominio de Lectina tipo C • Dectina-2 • Miembro 10 de la Superfamilia de Lectinas tipo C (Dominio de Reconocimiento de Carbohidratos, Dependiente de Calcio) • Lectina 2 tipo C Asociada a Células Dendríticas • CLECSF10 	<ul style="list-style-type: none"> • Se une a carbohidratos de alta manosa de manera dependiente de Ca²⁺ • Receptor funcional de alfa-mananos de hifas de <i>C. albicans</i> • También reconoce alérgenos de ácaros caseros y hongos, de manera dependiente de manosa. Promueve la producción de cistenil-leucotrienos • Reconoce elementos solubles de huevos de <i>Schistosoma mansoni</i>, alterando las respuestas inmunes adaptativas 	Syk	0.971
CARD9	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Miembro 9 de la familia que contiene el dominio de reclutamiento de caspasa • CANDF2 	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína adaptadora que juega un papel esencial en la respuesta inmune innata a varios patógenos intracelulares como <i>Candida albicans</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> • Se encuentra en el cruce de las vías de señalización de receptores con dominios ITAM, TLRs y NOD2 • Probablemente controla varias vías de señalización de la inmunidad innata dependiendo del patógeno intracelular 	Syk	0.967
		<ul style="list-style-type: none"> • Receptor para fragment Fc de IgE 	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína adaptadora que contiene un motivo ITAM que transduce señales desde varios receptores inmunes • Puede funcionar cooperativamente con otros receptores • Está relacionada funcionalmente con la activación de neutrófilos mediada por la integrina β2 (CD18). También está 		

FCER1G	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Cadena γ de receptor Fc • Receptor Fcϵ • FCRG 	<p>involucrada en la activación plaquetaria mediada por la integrina $\alpha 2$</p> <ul style="list-style-type: none"> • Como componente del receptor de alta afinidad para IgE, media la señalización alérgica inflamatoria en mastocitos • Como un componente constitutivo del complejo del receptor para IL-3, media selectivamente la producción de IL-4 en basófilos, induciendo a las células T hacia un fenotipo Th2 • Se asocia con los receptores de reconocimiento de patrones CLEC4D y CLEC4E para formar un complejo de señalización en células mieloides 	Syk / CD11b / CD18	0.988 / 0.962 / 0.973
FCGR2A	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Receptor IIa para fragmento Fc de IgG • CDw32 • IGFR2 • CD32 • Receptor de baja afinidad II-A para región Fc de inmunoglobulina gamma 	<ul style="list-style-type: none"> • Se une a la región Fc de las inmunoglobulinas gamma • Al unirse a IgG inicia las respuestas celulares en contra de patógenos y antígenos solubles • Promueve la fagocitosis de antígenos opsonizados 	Syk / CD11b / CD18	0.974 / 0.987 / 0.947
FCGR1A	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Subunidad Alfa del Receptor para Fragmentos Fc de IgG • CD64A • IGFR1 	<ul style="list-style-type: none"> • Receptor de alta afinidad para la región Fc de inmunoglobulinas gamma. Funciona tanto en las respuestas inmunes innatas, como en las adaptativas. Se expresa en macrófagos, monocitos y neutrófilos 	Syk	0.976
FCER1A	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Subunidad Alfa del Receptor de Alta Afinidad para Inmunoglobulinas Epsilon • FCE1A • FcER1 	<ul style="list-style-type: none"> • Se une a la región FC de inmunoglobulinas épsilon • Responsable por iniciar la respuesta alérgica. La unión del alérgeno a la IgE unida al receptor lleva a la activación celular y a la liberación de mediadores (como histamina) responsables por las manifestaciones de una alergia • El mismo receptor también induce la secreción de linfoquinas importantes 	Syk	0.963
LCP2	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína Linfocítica Citosólica 2 • Proteína de 76 kDa de Leucocitos que Contiene un Dominio SH2 • SLP76 	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína adaptadora relacionada con el síndrome de Wiskott-Aldrich y la Agammaglobulinemia Autosómica Recesiva 4 • Cuando la integrina $\alpha v/\beta 3$ encuentra a su ligando, activa un complejo de señalización canónico en osteoclastos, el cual consiste en c-Src, Syk, Dap12, Slp76 (LCP2), Vav 3 y Rac, que permite a la célula extenderse y formar anillos de actina. Estos eventos también contribuyen a la inserción del lisosoma secretorio en la membrana plasmática conectada al hueso, para formar el borde rugoso que libera las moléculas degradadoras del hueso, HCl y 	Syk	0.994

			Catepsina K, en el ambiente de reabsorción		
STAT5A	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Transductor de señales y activador de la transcripción 5A • MGF • Proteína de unión a esperma secretada por el epidídimo 	<ul style="list-style-type: none"> • Como su nombre lo indica, tiene una doble función: transducción de señales y activación de la transcripción • Junto con STAT5B y STAT3, regula el balance de citocinas pro y antiinflamatorias en MDMs estimulados a través de receptores de reconocimiento de patrones⁸⁷ • Media las respuestas celulares de los receptores activados FGFR1, 2, 3 y 4 • Regula la expresión de las proteínas de la leche durante la lactancia 	Syk	0.968
VAV1	NA	Factor de Intercambio de Nucleótidos de Guanina Vav 1	<ul style="list-style-type: none"> • Acopla señales de tirosina cinasas con la activación de GTPasas Rho/Rac, llevando a la diferenciación o proliferación celular • Se expresa en células hematopoyéticas, es un transductor de señales crítico desde el TCR hacia las vías de ERK y NF-κB 	Syk	0.999
VAV3		Factor de Intercambio de Nucleótidos de Guanina Vav 3	<ul style="list-style-type: none"> • Factor de intercambio para las proteínas de unión a GTP RhoA, RhoG y, en menor medida, Rac1 • Responsable por la adhesión mediada por la integrina β2 (ITGB2/CD18) y, en menor medida, contribuye a la adhesión mediada por la integrina β3 (ITGB3) • Puede ser importante para la señalización mediada por integrinas, al menos en algunos tipos celulares. En osteoclastos, se requiere, junto con la tirosina cinasa Syk, para la señalización a través de la integrina αv/β1 (ITGAV/ITGB1), un evento crucial para la organización y función adecuadas del citoesqueleto • Necesaria para la sanación adecuada de las heridas. Durante el proceso de curación de heridas, se requiere para la formación de la copa fagocítica que precede a la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos por macrófagos 	Syk	0.986
RAC2	NA	<ul style="list-style-type: none"> • GTPasa pequeña de la familia Rac 2 • Sustrato 2 de la toxina botulínica C3 relacionada a Ras • p21-rac2 • EN-7 • HSPC022 • GX 	<ul style="list-style-type: none"> • GTPasa pequeña asociada a la membrana plasmática, la cual cicla entre un estado activado unido a GTP y uno inactivo unido a GDP. En el estado activo se une a varias proteínas efectoras para regular respuestas celulares como procesos secretorios, fagocitosis de células apoptóticas y polarización de células epiteliales • Aumenta la producción de ROS por la NADPH oxidasa • Regulador putativo de JNK 	Syk	0.957

ITGB1	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Integrina $\beta 1$ • Receptor de fibronectina • Polipéptido beta • CD29 • MDF2 • MSK12 • Glicoproteína Ila • FNRB 	<ul style="list-style-type: none"> • Las integrinas $\alpha X/\beta 1$ (X=1-11) reconocen una gran variedad de ligandos como colágeno, fibronectina, fibrinógeno, laminina, trombospondina, etc y a algunos otros receptores de adhesión como VCAM1 • Las integrinas $\alpha X/\beta 1$ participan en procesos como regulación de la adhesión celular y el depósito de laminina en la ECM, promoción de la movilidad de las células endoteliales y angiogénesis, y el ensamblaje de la ECM y la formación de nódulos óseos mineralizados 	CD11b	0.96
ITGAX	NA	<ul style="list-style-type: none"> • CD11c • Subunidad Alfa X de Integrinas • Subunidad Alfa de Receptor para Complemento 4 • Leu M5 • SLEB6 • Subunidad Alfa de Antígeno de Superficie de Leucocitos P150,95 	<ul style="list-style-type: none"> • La integrina $\alpha X/\beta 2$ es un receptor para fibrinógeno. Reconoce la secuencia G-P-R en el fibrinógeno • Media la interacción célula-célula durante las respuestas inflamatorias • Es especialmente importante para la adhesión y quimiotaxis de monocitos 	CD11b / CD18	0.954 / 0.997
CEACAM8	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Molécula de adhesión celular 8 • Molécula de adhesión celular 8 relacionada al antígeno carcinoembrionario • CD67 • CD66b • CGM6 • NCA-95 	<ul style="list-style-type: none"> • Glicoproteína de superficie que juega un papel en la adhesión celular dependiente de Ca^{2+} • Media la adhesión celular heterofílica con otras moléculas de adhesión relacionadas con el antígeno carcinoembrionario, como CEACAM6 	CD11b	0.969
CD14	NA	Glicoproteína rica en leucina específica de células mieloides	<ul style="list-style-type: none"> • Correceptor para lipopolisacárido (LPS) bacteriano • Actúa a través de MyD88, TIRAP y TRAF6, lo cual resulta en la activación de NK-kB, secreción de citocinas y una respuesta inflamatoria • Actúa como correceptor para el heterodímero TLR2:TLR6 en respuesta a los lipopéptidos diacilados y para el heterodímero TLR2:TLR1 en respuesta a lipopéptidos triacilados, estos grupos inducen la señalización desde la superficie celular y subsecuentemente son llevados hacia el aparato de Golgi en una vía dependiente de balsas lipídicas 	CD11b / CD18	0.985 / 0.979
		<ul style="list-style-type: none"> • C1qR(P) • CDw93 • Subcomponente del Receptor 1 para el Componente de Complemento 1 Q 	<ul style="list-style-type: none"> • Receptor (o elemento de un complejo más grande de receptor) para C1q, Lectina de Unión a Manosa y Proteína Surfactante Pulmonar A • Puede mediar el aumento de la fagocitosis en monocitos y 		

CD93	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína 4 Asociada la Remodelación de Matriz • MXRA4 • EC5M3 • DJ737E23.1 	<p>macrófagos luego de su interacción con colágenos solubles de defensa</p> <ul style="list-style-type: none"> • Puede jugar un papel en la adhesión intercelular 	CD11b / CD18	0.962 / 0.936
CD300A	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Miembro 12 de la superfamilia de las inmunoglobulinas • IGSF12 • Molécula 8 parecida a CMRF35 • CMRF-35-H9 • CMRF5H • Receptor inhibitorio de células NK • IRC1/IRC2 	<ul style="list-style-type: none"> • Receptor inhibitorio que puede contribuir a la regulación negativa de la actividad citolítica de las células NK, y de la desgranulación de los mastocitos • Regula negativamente la señalización de los TLRs mediada por MyD88 pero no por TRIF, a través de la activación de PTPN6 (SHP-1) 	CD11b / CD18	0.951 / 0.949
CD177		<ul style="list-style-type: none"> • HNA2a • PRV1 • NB1 • Proteína 1 de Policitemia Rubra Vera • Aloantígeno de Neutrófilos Humanos 2a 	<ul style="list-style-type: none"> • Media, en asociación con CR3 (CD11b/CD18), la activación de neutrófilos preactivados con TNF-α, incluyendo la degranulación y la producción de superóxido • Evita la internalización de la integrina β2 (CD18) y atenúa la señalización de quimiocinas, favoreciendo la adhesión sobre la migración • Su interacción heterofílica con PECAM1 de células endoteliales juega un papel en la migración transelelial de neutrófilos in vivo 	CD11b	0.937
CD47	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína asociada a integrinas • IAP • MER6 • OA3 	<ul style="list-style-type: none"> • Receptor para SIRPA, su unión evita la maduración de células dendríticas inmaduras e inhibe la producción de citocinas por células dendríticas maduras. • Su interacción con SIRPG media adhesión celular, aumenta la proliferación dependiente de superantígeno mediada por células T y coestimula la activación de células T • Puede jugar un papel en el transporte membranal y/o la transducción de señales dependiente de integrinas • Puede prevenir la eliminación prematura de eritrocitos 	CD11b	0.95
SIRPA	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína reguladora de señales alfa de • SHPS1 • BIT • MFR • p84 • CD172a • MYD-1 	<ul style="list-style-type: none"> • Receptor de superficie celular para CD47 parecido a inmunoglobulina • Su interacción con CD47 evita la maduración de células dendríticas inmaduras e inhibe la producción de citocinas por células dendríticas maduras • Actúa como una proteína de anclaje e induce la translocación a la membrana de PTPN6 (SHP-1), PTPN11 (SHP-2) y otras proteínas asociadas • Involucrada en la regulación negativa de respuestas celulares (acopladas a tirosina 	CD11b	0.96

			<p>cinasas receptoras) inducidas por adhesión celular, factor de crecimiento o insulina</p> <ul style="list-style-type: none"> • Media la regulación negativa de fagocitosis, activación de mastocitos y activación de células dendríticas 		
HCK	2.7.10.2	<ul style="list-style-type: none"> • Cinasa de células hematopoyéticas • p59-HCK/p60-HCK • JTK9 	<ul style="list-style-type: none"> • Tirosina cinasa de proteínas no receptora. Se encuentra en células hematopoyéticas. • Transmite señales desde receptores de superficie celular y juega un papel importante en la regulación de las respuestas inmunes innatas, incluyendo funciones de monocitos, neutrófilos, macrófagos y mastocitos, fagocitosis, supervivencia y migración • Actúa río debajo de receptores para fracción Fc de anticuerpos como FCGR1A y FCGR2A, pero también CSFR, PLAUR, IFNGR, IL2R, IL6R, IL8R e intrgrinas como ITGB1 e ITGB2 (CD18) • Fosforila a CBL en respuesta a la activación de receptores Fc • Fosforila ADAM15, BCR, ELMO1, FCGR2A, GAB1, GAB2, RAPGEF1, STAT5B, TP73, VAV1 y WAS 	CD11b / CD18	0.965 / 0.979
MMP2	3.4.24.24	<ul style="list-style-type: none"> • Gelatinasa A • Metaloproteasa 2 de Matriz Extracelular • TBE-1 • Colagenasa Tipo IV de 72kDa • CLG4A • MONA 	<ul style="list-style-type: none"> • Metaloproteasa ubicua que está involucrada en diversas funciones como la remodelación de la vasculatura, angiogénesis, reparación tisular, invasión tumoral, inflamación y ruptura de la placa aterosclerótica • PEX, el fragmento no catalítico C-terminal de MMP2, posee propiedades antiangiogénicas y antitumorales, e inhibe la migración celular y la adhesión a FGF2 y Vitronectina. Es un ligando de la integrina $\alpha V/\beta 3$ de superficie de vasos sanguíneos 	CD11b	0.941
MMP9	3.4.24.35	<ul style="list-style-type: none"> • Gelatinasa B • GELB • Metaloproteasa de ECM 9 • Gelatinasa de 92kDa • Colagenasa tipo IV • CLG4B 	<ul style="list-style-type: none"> • Puede jugar un papel esencial en la proteólisis local de la ECM y en la migración leucocitaria • Puede jugar un papel en la reabsorción osteoclástica de hueso • Proteolisa KiSS1, Colágeno IV y V y Fibronectina 	CD11b / CD18	0.969 / 0.946
CLEC4D	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Miembro D de la familia 4 del dominio de lectinas tipo C • Miembro 8 de la superfamilia de lectinas tipo C (dominio de reconocimiento a carbohidratos dependiente de Ca^{2+}) • Receptor 6 parecido a lectina tipo C 	<ul style="list-style-type: none"> • Lectina dependiente de Ca^{2+} involucrada en el reconocimiento innato de patrones moleculares asociados a patógenos. • Cuando el componente micobacteriano TDM se une a este receptor, se induce la fosforilación del ITAM del FCER1G, que lleva a la activación de Syk, CARD9 y NF-κB, resultando en la maduración de las células presentadoras de antígeno que permitirán la generación de células T efectoras Th1 y Th17 	CD11b	0.943

		<ul style="list-style-type: none"> • MCL • Dectina 3 • CD368 	<ul style="list-style-type: none"> • Funciona como receptor endocítico. Podría estar involucrado en la internalización de antígenos en el sitio de infección, ya sea para eliminación o para procesamiento y presentación a células T 		
CLEC12A	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Miembro A de la Familia 12 del Dominio de Lectinas tipo C • Receptor Inhibitorio Mieloide Parecido a Lectina Tipo C • Lectina 2 Asociada a Células Dendríticas • DCAL-2 • CLL-1 • MICL • CD371 	<ul style="list-style-type: none"> • Receptor de superficie celular que modula la señalización y media la fosforilación de en tirosina de MAP cinasas blanco • Su expresión disminuye en leucocitos activados reclutados al sitio de inflamación 	CD11b / CD18	0.950 / 0.933
CLEC5A	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Miembro 5 de la Familia 5 del Dominio de Lectinas Tipo C • MDL-1 • Lectina Mieloide 1 de Asociación a DAP12 	<ul style="list-style-type: none"> • Receptor de macrófagos crítico para los serotipos 1-4 del virus del dengue • La unión del virus del dengue a CLEC5a dispara la señalización a través de la fosforilación de TYROBP. Esta interacción no resulta en la entrada viral, pero estimula la liberación de citocinas proinflamatorias 	CD11b / CD18	0.947 / 0.934
SELPLG	NA	<ul style="list-style-type: none"> • CLA • Ligando de Selectina P • PSLG-1 • CD162 	<ul style="list-style-type: none"> • Un proteoglicano tipo SLe(x), que interactúa con alta afinidad con las selectinas E, P y L de manera dependiente de calcio, y media el rodamiento rápido de leucocitos sobre las superficies vasculares durante los pasos iniciales de la inflamación. Crítico para la captura inicial de leucocitos • Actúa como un receptor para el enterovirus 71 	CD11b / CD18	0.962 / 0.966
TNFRSF1B	NA	<ul style="list-style-type: none"> • CLA • Miembro 1B de la Superfamilia del Receptor para TNF • TNFBR • P75 • TNF-R75 • TNF-RII • CD120b • TNFR80 • TNFR2 	<ul style="list-style-type: none"> • Receptor con alta afinidad por TNFSF2/TNF-alfa y aproximadamente 5 veces menos afinidad por TNFSF1/infotoxina-alfa homotrimérica • El complejo TRAF1/TRAF2 recluta a los supresores apoptóticos BIRC2 y BIRC3 al TNFRSF1B/TNFR2 • Este receptor media la mayoría de los efectos metabólicos de TNF-alfa • La isoforma 2 bloquea la apoptosis inducida por TNF-alfa, lo cual sugiere que regula su función antagonizando con su actividad biológica 	CD11b / CD18	0.948 / 0.939
		<ul style="list-style-type: none"> • CD11a • Subunidad Alfa L de Integrina 	<ul style="list-style-type: none"> • La integrina ITGAL/ITGB2 (CD11a/CD18, LFA-1) es un receptor para ICAM1, ICAM2, ICAM3, ICAM4, ISG14 y F11R • Involucrada en una variedad de fenómenos inmunológicos, incluyendo la interacción leucocito-célula endotelial, eliminación medida por células 		

ITGAL	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Polipéptido Alfa del Antígeno 1 Asociado a la Función de Linfocitos • LFA-1A • P180 	<p>T citotóxicas, y eliminación dependiente de anticuerpos mediada por granulocitos y monocitos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Contribuye a la citotoxicidad de las células NK • Involucrada en la adhesión y transmigración de leucocitos, incluyendo células T y neutrófilos • LFA-1 en asociación con ICAM3, contribuye a la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos por macrófagos 	CD18	0.999
ITGAD	NA	<ul style="list-style-type: none"> • CD11d • ADB2 	<ul style="list-style-type: none"> • La integrina αD/β2 es un receptor para ICAM3 y VCAM1. Puede jugar un papel en procesos ateroscleróticos como la eliminación de las lipoproteínas de las placas, y en la fagocitosis de patógenos sanguíneos, materia particulada y eritrocitos senescentes 	CD18	0.983
ITGA4	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Integrina Alfa-IV • Integrina Alfa-4 • CD49d 	<ul style="list-style-type: none"> • Las integrinas α4/β1 (VLA-4) y α4/β7 son receptores para fibronectina. Reconocen uno o más dominios dentro de las regiones CS-1 y CS-5 de la fibronectina, empalmadas alternativamente. También son receptores para VCAM1. • La integrina α4/β1 (VLA-4) reconoce la secuencia Q-I-D-S en VCAM1 • La integrina α4/β7 también es un receptor para MADCAM1, reconoce su secuencia L-D-T • VLA-4 de células endoteliales activadas induce la agregación homotípica en la mayoría de líneas celulares leucocitarias positivas a VLA-4 	CD18	0.983
ITGAV	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Integrina Alfa-V • Polipéptido Alfa del Receptor de Vitronectina • CD51 • MSK8 • VNRA • VTNR 	<ul style="list-style-type: none"> • Las integrinas alfa-V (ITGAV) reconocen la secuencia R-G-D en una amplia variedad de ligandos. Son receptores para Vitronectina, Citotactina, Fibronectina, Fibrinógeno, Laminina, MMP2, Osteopontina, Osteomodulina, Protrombina, Trombospondina y cWF • En macrófagos humanos en cultivo, el M-CSF induce específicamente la expresión de integrina αV/β5, mientras que el GM-CSF induce rápidamente la expresión del mRNA y la proteína de superficie αV/β388 • <i>Mycobacterium avium-M. intracellulare</i> se une a la integrina receptora αV/β3 de monocitos y MDMs humanos⁸⁹ 	CD18	0.971
ITGA2	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Integrina Alfa 2 • CD49b • Subunidad Alfa 2 del Receptor de VLA (Activación Muy Tardía)-2 	<ul style="list-style-type: none"> • La integrina α2/β1 es un receptor para Laminina, Colágeno, propéptidos-C de Colágeno, Fibronectina y E-Cadherina. Reconoce la secuencia G-F-P-G-E-R con prolina hidroxilada del Colágeno. Es responsable por la adhesión de plaquetas y otras 	CD18	0.956

		<ul style="list-style-type: none"> • GPIa • HPA-5 	<p>células a colágenos, la modulación del Colágeno y la expresión genética de la Colagenasa, la generación de fuerza y la organización de ECM recién sintetizada</p>		
ITGA3	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Integrina Alfa 3 • CD49c • Subunidad Alfa 3 del Receptor de VLA-3 • Galactoproteína B3 • GAP-B3 • FRP-2 • MSK18 	<ul style="list-style-type: none"> • La integrina $\alpha 3/\beta 1$ es un receptor para Fibronectina, Laminina, Colágeno, Epiligrina, Trombospondina y CSPG4 • Las lipoproteínas de baja densidad aceleran la diferenciación de monocitos a macrófagos e inducen un incremento significativo del mRNA y la proteína de CD49c90 • Monocitos de sangre periférica tratados con GM-CSF durante 5-8 días (es decir, macrófagos activados) adquieren la capacidad de ensamblar a CD9, $\alpha 3/\beta 1$ y SHP-1 con CD46. Este complejo molecular puede conferir una alta permisividad al virus del sarampión, llevando a la inmunomodulación en macrófagos activados91 	CD18	0.969
ITGA1	NA	<ul style="list-style-type: none"> • CD49a • Cadena Alfa del receptor VLA-1 • Receptor de Laminina y Colágeno 	<ul style="list-style-type: none"> • La integrina $\alpha 1/\beta 1$, también conocida como Antígeno Muy Tardío (VLA)-1, se expresa normalmente en células mesenquimales, algunas células epiteliales, células T activadas y macrófagos. Gracias al dominio I de la porción extracelular de CD49a interactúa con moléculas de Colágeno en la ECM. A través de un mecanismo de señalización transmembranal "outside-in" media adhesión, migración, proliferación, remodelación de la ECM, y secreción de citocinas en células endoteliales, mesangiales, fibroblastos y células inmunes92 • Un subgrupo de células de Kupffer (macrófagos intrahepáticos) de células CD49a+ expresan altos niveles de marcadores de activación y maduración, y exhiben niveles basales de producción de TNF-α, IL-12 e IL-10 mayores que las células CD49a-, pero responden menos a la estimulación adicional de TLR 4,7 y 8 in vitro93 	CD18	0.960
ADAM8	3.4.24.-	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína 8 que Contiene Dominio de Desintegrina y Metaloproteasa de • Antígeno Superficie MS2 • CD156 	<ul style="list-style-type: none"> • Posible relación con la extravasación de leucocitos • Macrófagos antiinflamatorios activan la invasión en el adenocarcinoma pancreático incrementando la expresión de MMP9 y ADAM894 • ADAM8 puede estar involucrada en la destrucción de hueso en la artritis reumatoide dado que su expresión está aumentada en el pannus (proliferación de tejido sinovial) adyacente a erosiones en 	CD18	0.954

			desarrollo y aumenta la maduración de células parecidas a osteoclastos ⁹⁵		
RAP1A	3.6.5.2	<ul style="list-style-type: none"> • Rap1 • Proteína Relacionada a Ras, Rap-1a • KREV-1 • SMGP21 • C21KG • G-22K 	<ul style="list-style-type: none"> • Rap1a y su factor de intercambio C3G median la fagocitosis dependiente de FcgR en macrófagos alveolares⁹⁶ • Se activa en respuesta a varios estímulos extra e intracelulares. Tiene funciones conservadas en la ameba <i>Dictyostelium discoideum</i> y en células de mamífero que son importantes para la polaridad de la célula, adhesión a sustrato y a otras células, y otros procesos que involucran la regulación de la dinámica del citoesqueleto. Además, Rap1 se requiere para la formación de la vacuola permisiva a la replicación de <i>Legionella pneumophila</i>⁹⁷ 	CD18	0.936
TLN1	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Talina-1 • ILWEQ • KIAA1027 	<ul style="list-style-type: none"> • Participa en la activación de integrinas por señalización "inside-out" luego de que receptores acoplados a proteínas G reconocen a sus ligandos⁹⁸ • Contribuye a la quimiotaxis dependiente de la integrina $\alpha4/\beta1$ en macrófagos humanos, lo que sugiere que participa en un estadio tardío de la cascada de adhesión leucocitaria cuando el citoesqueleto experimenta un rearrreglo importante. La interrupción de la expresión de Tln1 o Kindlina-3 aumenta el desprendimiento de la célula de superficies cubiertas con ICAM-1⁹⁸ 	CD18	0.98
TLN2	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Talina-2 • ILWEQ • KIAA0320 	<ul style="list-style-type: none"> • Los macrófagos humanos expresan las dos isoformas de Talina, 1 y 2⁹⁹ • Tln2 parece ser el gen ancestral, Tln1 aparecería por duplicación génica tempranamente en el linaje de los cordados¹⁰⁰ • Tln2 puede jugar un papel importante en adhesión celular como un componente principal de las placas de adhesión focal que vinculan a las integrinas con el citoesqueleto de actina 	CD18	0.951
FLNA	2.1.1.43 6.3.4.4	<ul style="list-style-type: none"> • Filamina A • ABP-280 • Proteína Endotelial de Unión a Actina • ABPX • CSBS • CVD1 • FGS2 • NHBP • OPD1/2 	<ul style="list-style-type: none"> • FLNA es un entrecruzador de filamentos de actina y sirve como proteína de andamiaje mayormente involucrada en la regulación de la polimerización de actina¹⁰¹ • FLNA está involucrada en la estabilización del podosoma y su organización como rosetas y podosomas tridimensionales. Regula la proteólisis de la ECM mediada por los podosomas en macrófagos. Se requiere para la formación de rosetas de podosoma inducida por Hck. Es necesaria para la migración mesenquimal pero no para la ameboides¹⁰¹ 	CD18	0.965

II. ARTÍCULO REQUISITO



Article

Aminopeptidase N/CD13 Crosslinking Promotes the Activation and Membrane Expression of Integrin CD11b/CD18[†]

Laura Díaz-Alvarez^{1,2,*}, Mariana Esther Martínez-Sánchez³, Eleanor Gray⁴, Erandi Pérez-Figueroa⁵ and Enrique Ortega^{1,*}

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Inmunología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

² Posgrado en Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado, Edificio D, 1° Piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico

³ Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Dr. Ismael Cosío Villegas”, Mexico City 14080, Mexico

⁴ London Centre for Nanotechnology, Department of Physics and Astronomy, University College London, London WC2R 2LS, UK

⁵ Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City 06720, Mexico

* Correspondence: laura.diaz-alvarez@ciencias.unam.mx (L.D.-A.); ortoso@biomedicas.unam.mx (E.O.); Tel.: +52-5556-2238-34 (E.O.)

[†] This article is dedicated to the memory of Dr. Heliodoro Celis Sandoval, a friend, and mentor who will be dearly missed.



Citation: Díaz-Alvarez, L.; Martínez-Sánchez, M.E.; Gray, E.; Pérez-Figueroa, E.; Ortega, E. Aminopeptidase N/CD13 Crosslinking Promotes the Activation and Membrane Expression of Integrin CD11b/CD18. *Biomolecules* **2023**, *13*, 1488. <https://doi.org/10.3390/biom13101488>

Academic Editor: Xuexian Yang

Received: 23 August 2023

Revised: 21 September 2023

Accepted: 22 September 2023

Published: 6 October 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The $\beta 2$ integrin CD11b/CD18, also known as complement receptor 3 (CR3), and the moonlighting protein aminopeptidase N (CD13), are two myeloid immune receptors with overlapping activities: adhesion, migration, phagocytosis of opsonized particles, and respiratory burst induction. Given their common functions, shared physical location, and the fact that some receptors can activate a selection of integrins, we hypothesized that CD13 could induce CR3 activation through an inside-out signaling mechanism and possibly have an influence on its membrane expression. We revealed that crosslinking CD13 on the surface of human macrophages not only activates CR3 but also influences its membrane expression. Both phenomena are affected by inhibitors of Src, PLC γ , Syk, and actin polymerization. Additionally, after only 10 min at 37 °C, cells with crosslinked CD13 start secreting pro-inflammatory cytokines like interferons type 1 and 2, IL-12p70, and IL-17a. We integrated our data with a bioinformatic analysis to confirm the connection between these receptors and to suggest the signaling cascade linking them. Our findings expand the list of features of CD13 by adding the activation of a different receptor via inside-out signaling. This opens the possibility of studying the joint contribution of CD13 and CR3 in contexts where either receptor has a recognized role, such as the progression of some leukemias.

Keywords: CD13; CR3; CD11b; cell signaling; macrophages; bioinformatics; cytokines

1. Introduction

CD13, or aminopeptidase N, is a cell membrane ectoenzyme that is considered a marker of the myelomonocytic lineage [1]. Most of its 960 aa are located extracellularly, roughly 25 aa constitute the transmembrane portion and only 7–10 aa correspond to the intracellular portion of the protein [2]. The intracellular and extracellular segments of CD13 have distinct functions. The enzymatic activity is located in the extracellular domains and accounts for CD13's role in the processing of bioactive peptides. The intracellular portion, on the other hand, mediates signal transduction when the receptor is crosslinked. This signaling activity is independent of its peptidase activity. Thus, CD13 can mediate cellular processes like phagocytosis and the subsequent respiratory burst, cell migration, and adhesion [3–5]. Signal transduction takes place despite the shortness of the intracellular

tail with only a single potential p-Tyr and the absence of classical signaling sequences like ITAMs. Due to its wide range of activities, CD13 is considered a “moonlighting” protein.

Complement receptor 3 (CR3, Mac-1, or integrin $\alpha M/\beta 2$) is a member of a group of heterodimeric membrane proteins called α/β integrins. It is composed of the peptides CD11b (exclusive to CR3) and CD18; thus, it is also called CD11b/CD18 [6]. CR3 is primarily expressed in leukocytes like neutrophils, monocytes, macrophages, and dendritic cells [7]. CR3 has two main physiological roles. First, it acts as a phagocytic receptor for particles and pathogens opsonized with iC3b complement fragments (reviewed in [8]). Second, it is an adhesion molecule that participates in leukocyte extravasation during inflammation due to its ability to bind ligands present in endothelial cells [9,10]. The activation of CR3, that is, the transition from its low-affinity to its high-affinity conformation, occurs either through ligand recognition (outside-in signaling) or via an intracellular signal coming from a different cell surface receptor (inside-out signaling). Some signaling molecules can participate in both CR3 inside-out and outside-in signaling, including Rap1, RIAM, Talin, Kindlin, and Syk [7,11–14].

The link between CD13 and CR3 is also supported by *in vivo* evidence, as both molecules can be found together in functional microdomains within the cell membrane called lipid rafts [15]. These structures are key to cell signaling since they bring components of specific pathways close together, thus decreasing the possibility of fortuitous activation or blocking of signals from other cascades (reviewed in [16,17]).

In summary: i) integrins like CR3 can be activated by the engagement of other receptors due to a mechanism known as inside-out signaling, as is the case for Fc γ Rs [18,19], with which CD13 shares the function of primary phagocytic receptor as well as the activation of many signaling molecules, and ii) both CD13 and CR3 can mediate functions such as phagocytosis, adhesion, and respiratory burst. Moreover, CD13 and CR3 can be found in physical proximity as both are present in lipid rafts [15], which is a strong indicator of a functional relationship. Additionally, a few publications have shown a functional link between CD13 and integrins: Carrascal et al. demonstrated that the expression of CD13 is associated with that of integrin $\alpha_v\beta_3$ in breast cancer [20], and Ghosh et al. [21] showed that CD13 modulates the trafficking of integrin $\beta 1$ via IQGAP, ARF6, and EFA6 in Kaposi sarcoma and human cervical cancer epithelial cells. In this work, we report the existence of a previously undescribed signaling pathway that links CD13 and CR3 in human macrophages using an integrated analysis of bioinformatics and experimental data.

First, we ascertained that crosslinking CD13 using monoclonal antibodies causes the activation of CR3. Second, we established the existence of at least two levels of control for the activation of CR3 following CD13 crosslinking: one that involves the inside-out signaling cascade that directly links both receptors and the second one that regulates the membrane expression of CR3. Third, we measured a panel of 12 cytokines and showed that, even at a short time after CD13 stimulation, CR3 activation is accompanied by the secretion of pro-inflammatory cytokines. Fourth, we used the information yielded by experiments along with the interrogation of molecular ontology bioinformatic databases, text mining analyses, and a manually curated functional protein interaction network, to suggest the components of the signal transduction pathway that leads to the activation and membrane expression of CR3 following CD13 crosslinking. A summary of our workflow can be found in Supplementary Figure S1.

Our findings have implications for the study of conditions in which the expression of CD13 is related to disease progression, as it is in breast cancer, where CD13 is linked to the development of metastases [20], a phenomenon largely driven by integrins.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and Antibodies

The RPMI-1640 medium was purchased from Gibco Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Recombinant human (rh) M-CSF was from PeproTech (Cranbury, NJ, USA). Lymphoprep was from Axis-Shield PoC AS (Oslo, Norway). All culture media were supplied

mented with 10% heat-inactivated FBS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) unless otherwise stated, 2 mM L-glutamine, 100 µg/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1 mM sodium pyruvate solution, and 1% MEM non-essential amino acids solution (100X) (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Murine monoclonal IgG1 anti-human CD13 (Mab C) and anti-human CD32 (Mab IV.3) were produced and purified in our laboratory from supernatants of the corresponding hybridomas [4]. Fab fragments were prepared from the purified antibodies with immobilized Ficin (Pierce, Rockford, IL, USA), following the manufacturer's instructions. Murine monoclonal APC anti-human CD11b (IgG1, clone ICRF44) and FITC anti-human CD11b (activated) antibody (IgG1, clone CBRM1/5) were from Biolegend (San Diego, CA, USA). Goat anti-mouse (GaM) polyclonal IgG F(ab)'2 fragments were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). Polyclonal FITC rabbit anti-mouse antibody was purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Src inhibitor-1, U-73122 hydrate, Cytochalasin D, and BAY 61-3606 were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Cell Culture

Tohoku Hospital Pediatrics-1 (THP-1) cells (ATCC) were maintained in a humidified atmosphere at 37 °C with 5% CO₂ in RPMI-1640 medium complemented as recommended by the selling company. For differentiation into macrophages, cells were seeded at 4.5×10^6 /10 cm plate or 8×10^5 /well in 6-well plates, in complemented RPMI-1640 medium and stimulated with 20 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for three days. Cells were washed once with warm PBS and incubated with fresh medium for 24 h before use. Differentiation was confirmed with CD11b expression (Supplementary Figure S2). All experiments carried out with cells from human donors were performed following the Ethical Guidelines of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico City, Mexico. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from anonymous healthy male donors' buffy coats obtained from the blood bank at Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Secretaría de Salud, Mexico City, Mexico, using gradient centrifugation with Lymphoprep, as previously described [4]. For monocyte isolation, PBMCs were washed three times with PBS, pH 7.4, using centrifugation at $400 \times g$ for 10 min. After the last wash, cells were resuspended in serum-free RPMI-1640 medium complemented as described before and were seeded ($5\text{--}6 \times 10^7$ PBMCs/plate) in 100 mm \times 20 mm cell culture-treated polystyrene culture dishes (Corning, New York, NY, USA). Cultures were maintained in a humidified atmosphere at 37 °C with 5% CO₂ for 1 h to allow monocytes to adhere to the plastic plate. Non-adherent cells were eliminated with gentle washing, and adherent cells, enriched for monocytes ($\geq 95\%$ purity, as determined with flow cytometry using CD14 as a marker of the monocytic population), were cultured for 7–10 days, for differentiation into macrophages, in RPMI-1640 medium complemented as described before plus 5 ng/mL rh M-CSF at 37 °C. For experiments, macrophages were harvested with gentle cell scraping.

2.3. CR3 Activation

The cells were incubated for 3 h in serum-free supplemented RPMI-1640 with or without inhibitors (10 mM BAY, 20 mM Src inhibitor-1, 5 mM U-73122 hydrate, or 10 mM cytochalasin D). Then, they were harvested. Freshly harvested macrophages incubated without inhibitors were called "pre-treatment". Thus, the treatment consisted of incubating 0.25×10^6 cells/sample in 0.2 mL serum-free supplemented RPMI-1640 medium with 2.5 mg of mAb C (anti-CD13) or mAb IV.3 (anti-CD32, positive control) complete antibody for 30 min at 4 °C. The cells were washed three times with fresh medium and incubated with 4 mg of GaM F(ab)'2 fragments for 30 min at 4 °C. Immediately after, the cells were incubated for 10 min at 37 °C and then pelleted before being fixed with 1% paraformaldehyde (PFA) for 25 min at RT. The cell-free supernatants from certain samples were collected and stored at -20 °C for cytokine quantification (see below).

2.4. Flow Cytometry

To quantitate CD11b expression and activation, fixed samples were washed two times with cold PBS and stained with 50 mL of a 1:20 dilution of murine monoclonal APC anti-human CD11b (IgG1, ICRF44) or FITC anti-human CD11b (activated) antibody (IgG1, CBRM1/5) for 40 min at 4 °C. The cells were washed three times with cold PBS. Staining for CD13 or CD32 (FcγRII) was performed by incubation in 10 mg anti-CD13 or anti-CD32 mAbs in serum-free supplemented RPMI-1640 medium for 30 min at 4 °C. The cells were washed three times with the same medium, incubated with 1:500 GaM-FITC antibody for 30 min at 4 °C, and then washed three times with cold PBS and fixed with 1% PFA for 25 min at RT. Fluorescence intensity was measured using flow cytometry (Blue/red Attune cytometer, Applied Biosystems-Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Flow cytometry data were displayed either as MFI for cells with crosslinked CD13 vs. their activation controls or as integrated MFI (iMFI, percentage of positive cells multiplied by their MFI) for cells with CD13 crosslinked in the presence of inhibitors [22]. For the latter, a normalized proportion of the cells incubated with inhibitors vs. their respective controls is presented.

2.5. Cytokine Quantification

Samples from the CR3 activation experiments were used to quantify a panel of 12 cytokines. Specifically, supernatants from cells without antibodies (control) and cells with both primary and secondary antibodies (Mab C + sec) were assayed. The frozen supernatants were carefully thawed in ice and loaded as duplicates onto two Milliplex plates (Millipore Sigma, Darmstadt, Germany), one to detect IFN-α and a second one for IFN-γ, IL-12p70, IL-17a, IL-6, IL-1b, IL-2, IL-8, IL-4, IL-10, MCP-1, and TNF-α. The assays were performed according to the manufacturer's instructions and measured in a Luminex Multiplexing Instrument (Millipore Sigma, Darmstadt, Germany).

2.6. Theoretical Cell Signaling Interaction Network Assembly

We constructed the functional protein interaction network of CD13, Syk, and CR3 and their closest partners using combined interaction scores from STRING [23]. A functional association in this context means either physical contact, participation in the same metabolic pathway, and/or cellular process [24]. STRING scores are indicators of text mining and protein homology. Each type of evidence gives rise to an individual score for each likelihood of an interaction given currently available evidence in the database, which includes gene neighborhood, gene fusions, gene co-occurrence, experimental evidence, curated databases, and pairs of proteins. STRING computes combined scores by integrating the individual scores and correcting for the probability of randomly observing the interaction. Scores rank from 0 to 1, with 1 being the highest possible result.

The search for functional partners was performed individually for each interrogation query (CD13, CD11b, CD18, and Syk) and focused on human proteins. High confidence scoring molecules (0.8 and above) from the first layer of interactions with the query were considered. The resultant group of proteins was filtered based on the requirements for this particular inside-out signaling pathway: non-receptor kinases, adaptor proteins able to bridge CD13 to other components of the pathway, especially Syk, and inhibitory molecules like protein phosphatases or ubiquitin ligases. In some cases, other interacting receptors were considered, as they may provide insight into the reported mechanisms for this type of interaction. Namely, those similar to the studied receptors, CD13 and CR3: metalloproteases, phagocytic receptors, integrins, and other adhesion molecules. To ensure the quality and specificity of the network text mining STRING element, The GeneCards website [25] and the repository PubMed [26] were used to ascertain the suitability of each selected protein, i.e., to confirm the function of each node, as well as its gene and protein expression in myelomonocytic cells. Finally, the interaction network was manually curated according to experimental evidence gathered from previous publications.

2.7. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by a multiple comparisons test or a paired two-tailed *t*-test in the case of experiments with MDMs and cytokines. *p* values below 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Crosslinking CD13 Results in the Activation of CR3 (CD11b/CD18)

We assessed the activation status of CR3 (CD11b/CD18) following CD13 crosslinking on human macrophages. CD13 molecules on the surface of THP-1 macrophages were crosslinked using the complete anti-CD13 antibody mAb C as the primary antibody and GαM F(ab)² fragments as the secondary antibody. Next, the cells were stained with a FITC-anti-CD11b (activated) antibody and analyzed using the flow cytometer. The cells were first gated for size and granularity (Figure 1A), then for singlets (Figure 1B), and finally, for median fluorescence intensity in the BL1 (FITC) channel (Figure 1C,D). Figure 1C shows that the fluorescence histogram for the control unstimulated cells stained with anti-CD11b (activated) antibody overlaps with the auto-fluorescence of unstained cells. The controls are cells incubated either without antibodies or only with secondary antibodies. The resulting histograms demonstrate that incubation in the absence of an anti-CD13 antibody does not produce a nonspecific anti-CD11b (activated) signal. In contrast, panel D shows a representative histogram for the CR3 activation produced when CD13 is crosslinked using both primary and secondary antibodies. Figure 1E shows the average and SD in the MFI from CR3 activation in CD13-crosslinked cells (*n* = 3) along with its controls. A one-way ANOVA followed by a multiple comparisons test confirms that our negative controls, i.e., cells incubated with only primary or secondary antibodies, as well as freshly harvested macrophages (“pre-treatment”), show no significant difference with cells incubated without antibodies. Only the activation of CR3 in cells with either crosslinked CD32 (positive control [18,19]) or CD13 is significantly different from that in cells without antibodies (<0.01 and <0.0001, respectively). Figure 1F is a representative histogram for THP-1 macrophages incubated with Mab C and a secondary antibody coupled to FITC, showing that Mab C bounds efficiently to all cells. These results were consistent in MDMs (Supplementary Figure S3).

3.2. Syk, Src, PLCγ, and Actin Polymerization Participate in the Activation of CR3 Triggered by CD13 Crosslinking

In order to gain insight into the signaling pathway connecting CD13 crosslinking and the activation of CR3, we chemically inhibited some of the molecules related to the signaling of these receptors.

We assessed how these inhibitors affect the activation of CR3 triggered by CD13 crosslinking. For this, we pre-incubated THP-1 macrophages with either BAY 61-3606 (BAY), Src kinase inhibitor-1 (SKI-1), U73122, cytochalasin D (Cyt D), or no inhibitor (control) for 3 h in a serum-free medium. Then, the cells were harvested and CD13 on their surface was crosslinked. Finally, we measured CR3 activation using flow cytometry. Figure 2A shows representative histograms comparing cells stained with the anti-CD11b (activated) with or without inhibitors. BAY augments the signal, while Cyt D, SKI-1, and U73122 diminish it. Such differences were statistically confirmed and are represented in Figure 2B, where the average and SD of the proportion of each inhibitor-incubated sample vs. their respective control is plotted. The *p*-values for both BAY and SKI-1 are <0.0001 and <0.001 for both Cyt D and U73122 (*n* = 3). These results indicate that Syk, Src, PLCγ, and actin polymerization have a role in the activation of CR3 triggered by CD13 crosslinking. It is noteworthy that incubation with BAY had the same effects on human MDMs (Supplementary Figure S4).

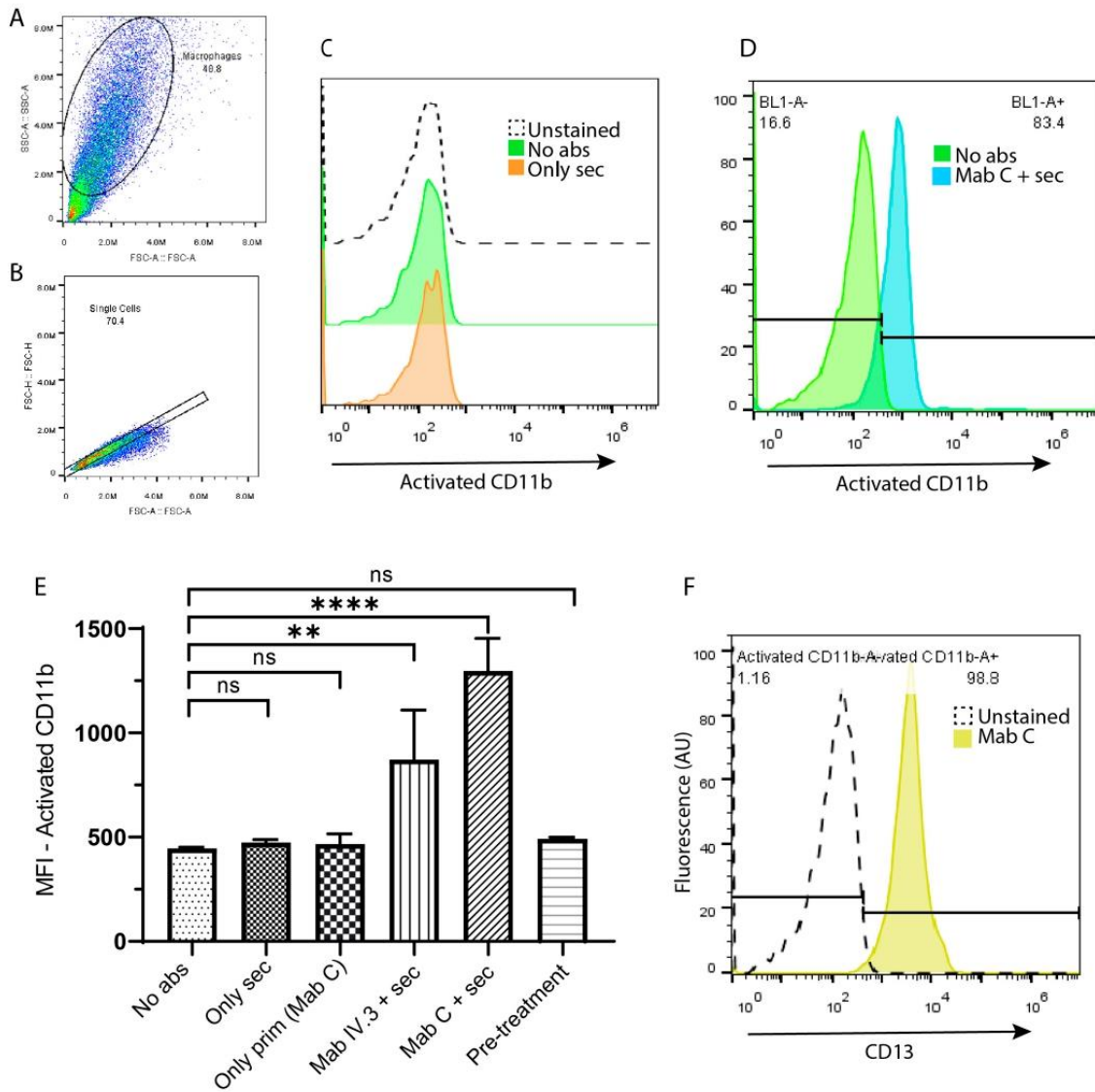


Figure 1. CD13 crosslinking activates CR3 in human THP-1 macrophages. (A) Cells were first gated for size and granularity, then for (B) singlets, and finally, for (C,D) MFI in the BL1 (FITC) channel. (C) Controls. (D) Representative histograms from a sample crosslinked with C (anti-CD13) and secondary antibodies vs. its control without antibodies. (E) Average and SDs from 3 independent experiments. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, ns = non-significant. (F) Representative histogram demonstrating that virtually all cells are positive for the CD13 stain.

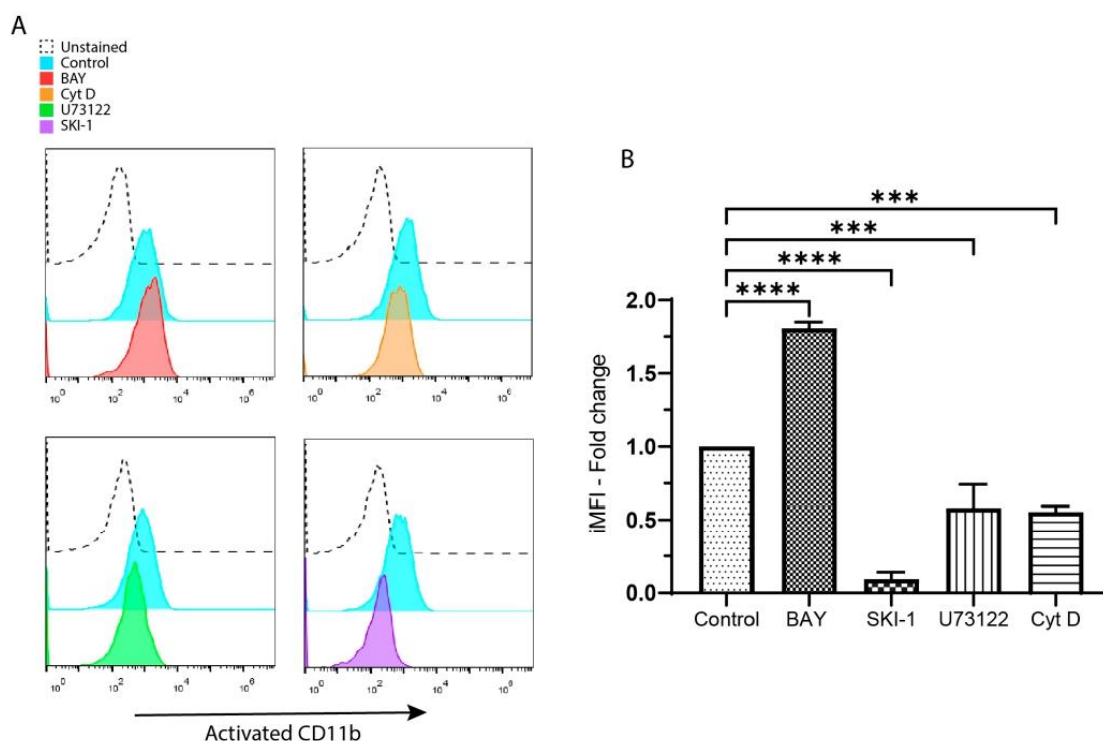


Figure 2. The inhibition of Src, PLC γ , and actin polymerization reduces the activation of CR3 (CD11b/CD18) triggered by CD13 crosslinking. The inhibition of Syk augments it. **(A)** Representative histograms from the activation of CR3 on cells with CD13 crosslinked in the presence of inhibitors for Syk (BAY), actin polymerization (Cyt D), PLC γ (U73122), and Src (SKI-1). **(B)** Average and SDs for the iMFI from 3 independent experiments. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

3.3. CD13 Crosslinking Also Controls CR3 Membrane Expression

In order to determine if CD13 crosslinking had any effect on the membrane expression of CR3, we evaluated CR3 membrane expression using flow cytometry in THP-1 macrophages. Figure 3A displays representative histograms showing that the signal from the controls (cells incubated without antibodies or only with secondary antibody) stained with an a-CD11b antibody coupled to APC practically overlaps with that of unstained cells. In contrast, Figure 3B shows that crosslinking CD13 on the surface of macrophages induces the surface expression of CR3. Figure 3C shows the average and SD for the MFIs of CD11b expression on freshly harvested macrophages (pre-treatment), control cells, and cells in which CD13 was crosslinked from three independent experiments. The overall expression of CR3 exhibits the same pattern as CR3 activation, except for cells before treatment. Cells stained before treatment have a basal CR3 level significantly different from that of cells treated without antibodies (control). These data indicate that basal CD11b membrane expression decreases after treating cells (two 30' incubations at 4 °C, three washes, and a 10' incubation at 37 °C) in the absence of antibodies or only with primary or secondary antibodies. Only CD13 crosslinking restores CR3 membrane expression, even at a higher level than pre-treatment.

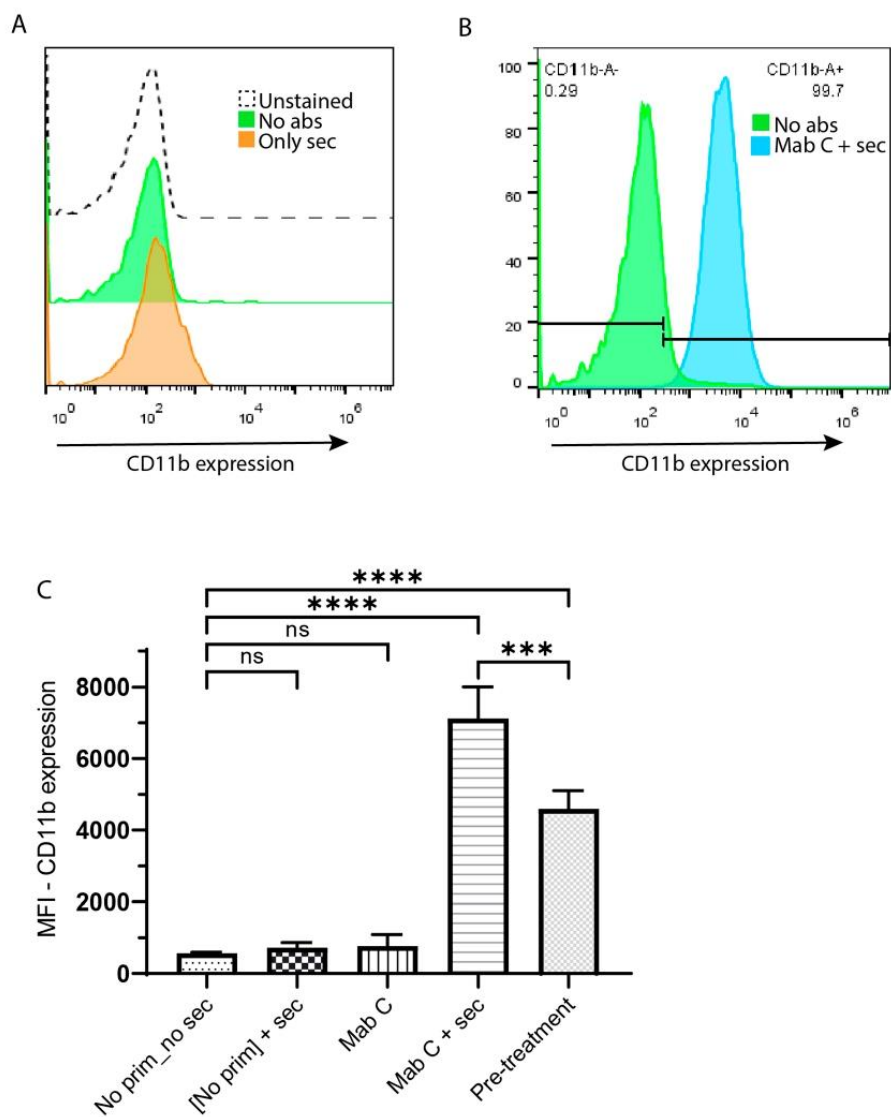


Figure 3. CD13 crosslinking promotes CR3 membrane expression in THP-1 macrophages. (A) MFI in the RL1 channel (APC) from unstained cells and, control cells treated without crosslinking antibodies or only with secondary antibody, stained with anti-CD11b(total). (B) Representative histograms from a sample crosslinked with mAb C (anti-CD13) and secondary antibodies vs its control without antibodies. (C) Average \pm SDs of MFIs of CD11b (total) expression on cells treated as indicated in the graph or non-treated cells. Data from 3 independent experiments. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. ns = non-significant.

3.4. Src, PLC γ , Syk, and Actin Polymerization Also Have a Role in CR3 Membrane Expression

After confirming that CD13 crosslinking also influences CR3 membrane expression, we investigated the possibility that the signaling pathway controlling this phenomenon and the one governing the activation of CR3 shared some of their components. For this, we pre-incubated THP-1 macrophages with either BAY, SKI-1, U73122, Cyt D, or no inhibitor (control) for 3 h in a serum-free medium. Then, the cells were harvested and CD13 on

their surface was crosslinked. Finally, we measured CR3 membrane expression using flow cytometry. Figure 4A shows representative histograms comparing cells stained with anti-CD11b (total) after stimulation by CD13 crosslinking in the presence of the different inhibitors. The pattern is similar to the one observed for CR3 activation: BAY augments the signal produced by the fluorochrome-coupled antibody in comparison with the control, while Cyt D, SKI-1, and U73122 diminish it. Such differences were statistically confirmed and are represented in Figure 2B, where the average and SD for the proportion of each inhibitor-incubated sample vs. their respective control is plotted. The p -value for SKI-1 was <0.0001 , <0.001 for both BAY and Cyt D and, 0.0221 for U73122 ($n = 3$). These results indicate that Syk, Src, PLC γ , and actin polymerization have a role in CR3 membrane expression influenced by CD13 crosslinking. Supplementary Figure S5 shows a comparison of the relation CD11b activation/expression in cells crosslinked in the presence of the different inhibitors.

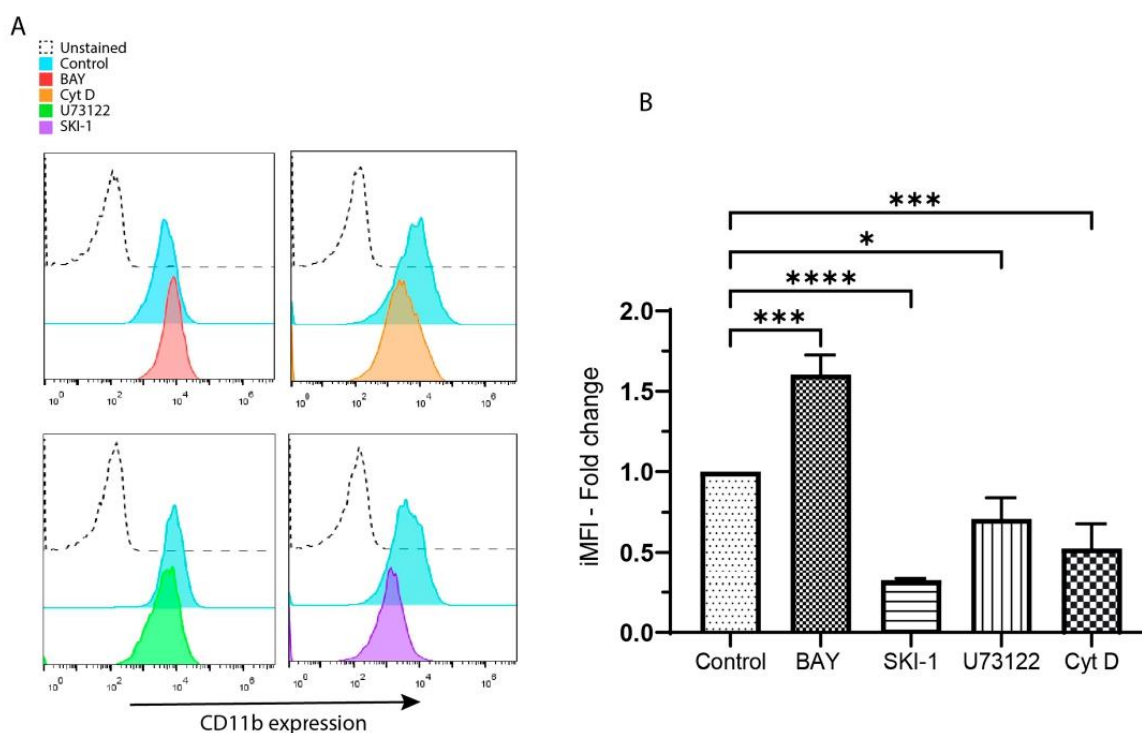


Figure 4. The inhibition of Src, PLC γ , and actin polymerization reduces the membrane expression of CR3 (CD11b/CD18) triggered by CD13 crosslinking. The inhibition of Syk augments it. (A) Representative histograms from the membrane expression of CR3 on cells with CD13 crosslinked in the presence of inhibitors for Syk (BAY), actin polymerization (Cyt D), PLC γ (U73122), and Src (SKI-1). (B) Average and SDs of the iMFI from 3 independent experiments. * $p < 0.0221$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

3.5. CR3 Activation Triggered by CD13 Crosslinking Is Accompanied by the Secretion of Inflammatory Cytokines

Immune cells commonly respond to stimuli by secreting cytokines. The array of secreted cytokines determines the events that will follow the original stimulus (e.g., pro-inflammatory or anti-inflammatory). This is the reason why these proteins largely help orchestrate the local and systemic response. Thus, it is of interest to know the milieu generated, i.e., the accompanying cytokine profile, when immune receptors activate, in this case, CR3. This does not mean that the activation and rise in membrane expression

of CR3 triggered by CD13 crosslinking are driven by cytokine secretion, rather, they are part of the overall cell response to a single stimulus. To this effect, we measured a panel of 12 cytokines. The cell-free supernatants of cells incubated without antibodies (control) and incubated with primary and secondary antibodies (Mab C + sec) were used to determine IFN- α , IFN- γ , IL-12p70, IL-17a, IL-6, IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-4, IL-10, MCP-1, and TNF- α . Only the pro-inflammatory cytokines IFN- α ($p = 0.0154$), IFN- γ ($p < 0.01$), IL-12p70 ($p = 0.0283$), and IL-17a (< 0.01) had a significant increase in their concentration compared with the control, as seen in Figure 5. IFNs reached an average of 30 pg/mL, and IL-12p70 and IL-17 reached an average of 8 pg/mL. Even though other cytokines like IL-8, TNF- α , and MCP-1 have higher concentrations, these were not significantly different from their controls.

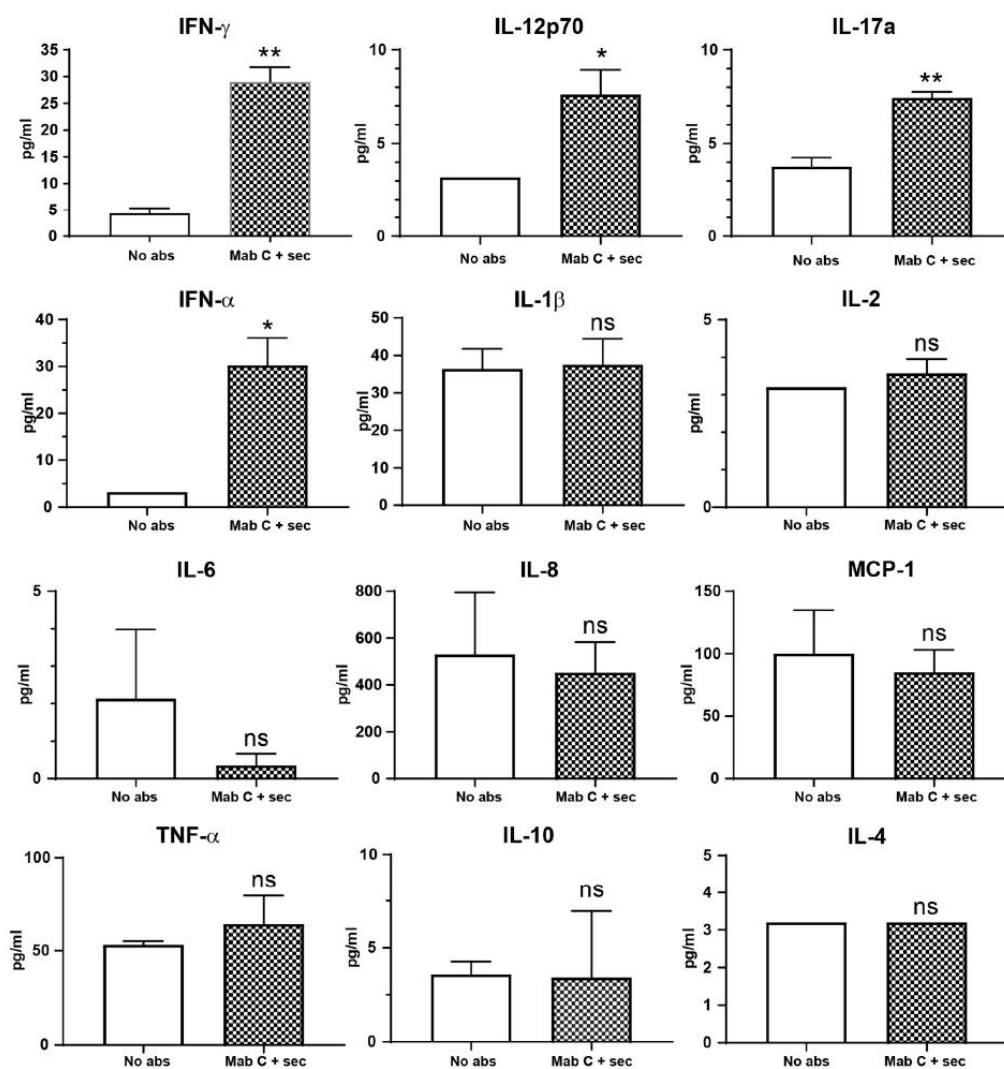


Figure 5. The activation of CR3 (CD11b/CD18) triggered by CD13 crosslinking is accompanied by the secretion of pro-inflammatory cytokines. Quantification of 12 cytokines present in the cell-free supernatant of cells with CD13 crosslinked and their control cells treated without antibodies. * $p < 0.05$ (0.0154 for IFN- α , and 0.0283 for IL-12p70), ** $p < 0.01$, ns = non significant. Average and SDs from 3 independent experiments.

3.6. The Interaction Network for CD13, Syk, and CR3 (CD11b/CD18) Functional Partners Contains 76 Proteins

The previous results showed that crosslinking CD13 on human macrophages induced the high-affinity conformation of CR3 and its membrane expression. Thus, we turned to bioinformatic databases to assemble an interaction network composed of functional partners of CD13, CR3, and Syk, one of the molecules explored in our chemical inhibition assays and a key signaling kinase in the immune system, particularly in myeloid cells, to propose a sequential mechanistic model for the inside-out signaling pathway that could account for the activation of CR3 following CD13 crosslinking.

To determine the potential set of proteins and pathways that participate in the CD13-CR3 inside-out-signaling cascade, we constructed an interaction network using information from public databases, the literature, and previous experimental work from our laboratory. Given the high number of potential candidates, network nodes were selected using the predicted interaction score, biological function, and presence in the target cell type.

A functional protein interaction network for CD13, Syk, and CR3 was assembled by selecting the proteins with the highest combined scores (0.8 or more) from the STRING database [23], as well as previously determined experimental interactions. Data mining the STRING element and the databases GeneCards [25] and PubMed [26] were used to confirm that the chosen proteins were present in the myelomonocytic lineage. Supplementary Figure S6 presents the main ontology clusters for the selected proteins. For those interrogation nodes that resulted in more than 50 proteins with combined scores ≥ 0.8 , the top 50 molecules were analyzed.

Using Syk as the interrogation query, we obtained a first layer of interactions among 158 proteins and STRING combined scores above 0.9. Twenty-nine entries were selected according to the established criteria, i.e., representing CD13 and/or CR3 known functional interactors or potential elements for the inside-out signaling pathway connecting the two of them. Two of these proteins were also selected in the CD11b and CD18 analyses. Supplementary Figure S7 includes the proteins selected to assemble the network, and the Venn diagram allows the identification of those molecules common to two or more interrogation queries. In the case of Syk, two of its interactors were also common with CD11b and CD18.

Polypeptide chains forming CR3 (CD11b (ITGAM) and CD18 (ITGB2)), were also subjected to this type of analysis. For CD11b, the first layer of interactions with STRING combined scores above 0.9 consisted of 167 proteins, resulting in 22 molecules of interest. Ten of these were also selected for CD18, as well as the two previously mentioned for both Syk and CD18.

Using CD18 as the interrogation query resulted in 184 interactors with a combined score of ≥ 0.9 . Twenty-five molecules of interest were chosen, 13 of which were exclusive to CD18, and the rest were shared with Syk and CD11b, as aforementioned.

Using CD13 as the interrogation query yielded 27 molecules with STRING combined interaction scores of 0.8 and above; these were filtered to four proteins of interest using the criteria of being either downstream signal inhibitors or enhancers, adhesion molecules, or co-receptors which, following text mining, might provide information on the signaling pathways necessary for interaction with CD13. Finally, 12 proteins for which an interaction with CD13 was previously experimentally determined (SYK, GRB2, PI3K, FAK, IQGAP1, SRC, JNK, p38, MEK-1, PKC, ERK 1/2, and SOS1) were added to the molecules of interest [5,27,28].

Figure 6 depicts the interaction network obtained, consisting of 76 non-redundant proteins. Of note, pink lines and bubbles represent interactions experimentally determined, including the ones contributed by this study. A detailed list of all proteins in the network, their main characteristics, and their corresponding interrogation nodes, is presented in Table S1.

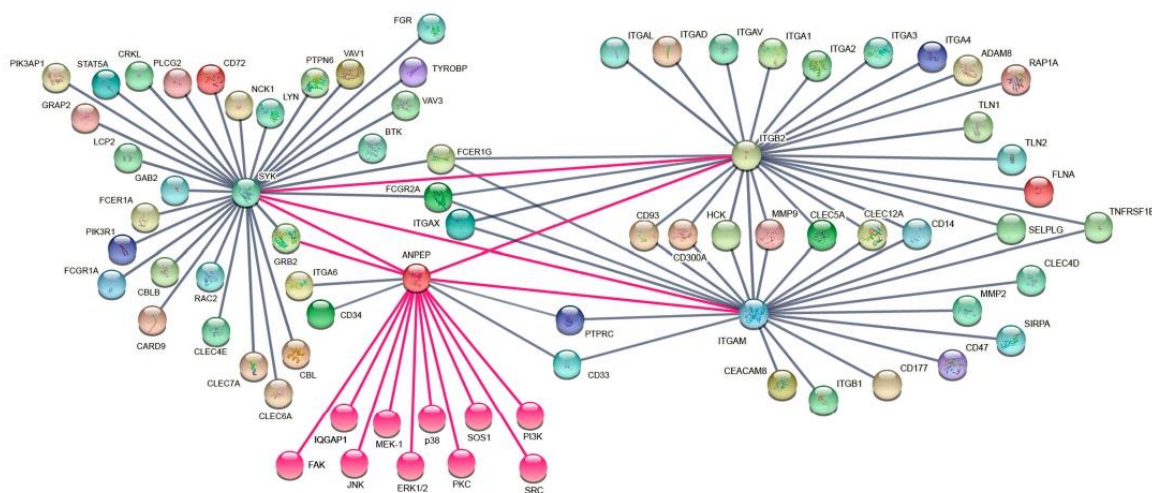


Figure 6. The interaction network for CD13, Syk, and CR3 functional partners contains 76 proteins. Nonredundant results from the analysis of the STRING highest scoring interacting partners among CD13, Syk, and CR3. Pink lines and bubbles represent the interactions experimentally determined in our laboratory and by others.

Next, based on our interaction network, we constructed a sequential mechanistic model of the CD13-CR3 inside-out signaling pathway (Supplementary Figure S8).

4. Discussion

CD13 is an ectopeptidase that, along with other proteins like CD157, CD73, CD38, and CD26, can initiate signaling events upon stimulation [27,29]. Despite the need for extra accessory proteins, the existence of receptors without tyrosine-kinase activity (non-RTKs) like these ectopeptidases, may have been retained during evolution as they provide a tighter cell activation control than receptor tyrosine kinases (RTKs). Unlike non-RTKs, RTKs can undergo spontaneous activation upon stochastic encounters in the cell membrane, which poses a risk when they are overexpressed, as they can lead to disease development. For instance, overexpression of the RTK human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) is associated with various cancers, including ovarian, prostatic, gastric, lung, and breast cancers. Furthermore, HER2 activation serves as a known mechanism of resistance to endocrine treatment in experimental models [30].

CR3 can exist in two main conformational states that correspond to a high or low affinity for its ligands, referred to as the active and inactive states, respectively. The high-affinity state can be reached either by outside-in or inside-out signaling (reviewed in [31,32]). We hypothesized that CD13 could functionally interact with integrins like CR3 by promoting its activation, considering the following two facts. First, the stimulation of many immune receptors activates CR3 via inside-out signaling, including but not limited to CD14, TLR2, TLR4, TLR9, and FcγRs [19,33,34]. Second, CD13 functionally interacts with other immune receptors, for example, crosslinking CD13 with monoclonal antibodies increases the phagocytic efficiency of particles directed to FcγRs [35]. Of note, due to the lack of reported natural ligands that stimulate CD13 signal transduction, so far crosslinking has been the stimulus of choice for this receptor [5,27,36].

We found that CD13, a non-RTK with a short cytoplasmic tail and no canonical signaling motifs [28], activates CR3 and controls its membrane expression. CD11b membrane expression does not always indicate activation, as shown by the different CD11b activation/total CD11b ratios in cells treated with various inhibitors. This supports the idea that CD13 crosslinking triggers two separate phenomena: expression involving Syk and actin polymerization and activation involving PLCγ. Notably, CD13 crosslinking is necessary to

initiate these signaling events. In the absence of antibodies or with only primary or secondary antibodies, CR3 is most likely internalized and only recycled back to the membrane upon CD13 crosslinking, potentially through a clathrin-mediated mechanism.

CD11b levels increase when monocytes differentiate into macrophages, i.e., it is a differentiation marker. This partially explains the enhanced potential of macrophages for mobility, adhesion, and phagocytosis, compared to their precursors [6]. Upon stimulation of immune receptors, associated factors activate, and, in many cases, their gene expression increases [37]. However, crosslinking CD13 on the surface of macrophages at 4 °C, followed by a brief ten-minute incubation at 37 °C, results in an even higher expression of CD11b on the cell membrane than the baseline differentiation levels (referred to as “pre-treatment” in our experiments). The interpretation of this phenomenon is that, first, certain *in vivo* scenarios require that CD11b membrane levels increase at shorter times than those allowed by gene expression. Thus, the existence of receptor reservoirs in the form of intracellular vesicles [38]. Second, CD13 may function as a sentinel, detecting stimuli that require the activation and involvement of CD11b, thereby facilitating a swift response to immunological challenges.

Subramani et al. [5] demonstrated that crosslinking CD13 on the human monocytic cell line U937 induces adhesion to endothelial cells and that this phenomenon is related to the phosphorylation of the receptor by Src, as well as to the recruitment of cytoskeleton-binding machinery. Thus, the selection of SKI-1 and Cyt D. BAY, a highly selective and widely used Syk inhibitor [39–41], was tried because Syk acts downstream of several immune receptors on myelomonocytic cells, including CD13 and integrins [3,41]. In fact, Zheng et al. [41] showed that after the glycoprotein VI on human platelets engages its ligand collagen, an inside-out signaling pathway sets off, activating Syk, which phosphorylates PLC γ , leading to the activation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Thus, our choice to also include the PLC γ inhibitor U73122.

Our sequential mechanistic model is supported by both STRING-predicted interactions and previous experimental data, making the pathway theoretically conceivable. For example, we chose Grb2 as an adaptor molecule bridging CD13 and Syk based on our previous findings of crosslinked CD13 co-precipitating with Grb2. Also, this molecule associates with Shc, Src, Syk, and SHP-1 during inside-out signaling between CD32a and $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin in human platelets [42,43]. Similar pathways have been observed in other systems, such as human neutrophil PSGL-1 binding endothelial P- and E-selectins, thus activating β_2 integrins CR3 and LFA-1 (reviewed in [7]). Another example is Rap1, chosen for being a key regulator of inside-out activation in phagocytic integrins like CR3, where signals from various receptors converge [44]. These findings highlight the effectiveness of combining experimental and bioinformatic approaches to unravel complex signaling pathways. Our model expands the understanding of the intricate inside-out signaling cascade.

Previous publications have linked cytokine production to the expression of CD13 in various cell types and contexts [45–49]. However, only a handful of studies have reported the secretion of cytokines as a result of CD13 stimulation in human myeloid cells. In a recent work from our group, Perez-Figueroa et al. [36] incubated human neutrophils for 24 h with the same primary and secondary antibodies we used in this study. A bead-based multiplex assay was used to determine the production of IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-6, and IL-10 in cell-free supernatants. From these, only IL-1 β and TNF- α showed a significant increase compared with the control. Similarly, Santos et al. [27] showed that the ligation of CD13 on U937 human monocytes upregulates the mRNA expression of IL-8, peaking at 2 h of incubation. In contrast, Villaseñor-Cardoso et al. [50] surveyed supernatants from human monocyte-derived DCs and macrophages for IL-6, IL-12, IL-10, and TNF- α , but found no increase in their concentration after 18 h of CD13 crosslinking. This result could be due to the use of sandwich ELISA, a less sensitive method. In this work, we measured a panel of 12 cytokines and detected the presence of pro-inflammatory cytokines accompanying the activation and rise in membrane expression of CR3 after only 10 min following CD13 crosslinking. Specifically, IFNs type 1 (IFN- α) and 2 (IFN- γ), IL-12p70,

and IL-17a increased significantly. As expected for such a short time after stimulation, the concentrations were lower than what other authors have reported for THP-1 macrophages. For example, we detected approximately 8 pg/mL IL-12, whereas Shabir et al. [51] and Souissi et al. [52] reported that THP-1 macrophages produce 100–125 pg/mL IL-12, albeit after 4–18 h of stimulation with 100 ng/mL LPS, a potent pro-inflammatory cytokine inducer. Similarly, Zhou et al. [53] reported that 24 h after infection with *Mycobacterium tuberculosis*, THP-1 macrophages secrete almost 300 pg/mL IL-12. Therefore, when both the time after stimulation and the method of detection are considered, it becomes evident that there is still a knowledge gap regarding the early cytokine response after CD13 crosslinking. Thus, time-course experiments and monitoring cytokine expression and secretion between 10 min and 18–24 h are necessary to determine if CD13 crosslinking can induce similar cytokine concentrations as other pro-inflammatory stimuli. Nevertheless, the cytokines we detected are biologically relevant to CD13-associated processes. Type 1 IFNs are canonical cytokines secreted as part of the antiviral response [54]; thus, it is expected that a viral receptor, like CD13 [55,56], drives its production. This is evidenced by the work of Yamaya et al. [57], who demonstrated that Type 1 IFN is secreted after the human coronavirus 229E, one of the many that cause common colds, engages its receptor CD13 on the surface of primary human nasal and tracheal epithelial cells. IL-12 is an early cytokine secreted by myeloid cells in response to PAMPs and DAMPs and induces the expression and secretion of IFN- γ (reviewed in [58–60]). Of note, the p70 subunit is also one of the two monomers constituting IL-23, another member of the IL-12 family of heterodimeric cytokines. In any case, both IL-12 and IL-23 contribute to the functions of Th1 and Th17 subsets of T lymphocytes, respectively. The secretion of these cytokines may also be related to CD13-induced endosome recycling, as these compartments are involved in the secretion of cytokines like TNF- α , IL-6, and IL-10 [61–63]. Nevertheless, the most intriguing of the CD13 crosslinking-induced cytokines is IL-17a. This is because it is primarily associated with the Th17 subpopulation of CD4⁺ T cells, where it was first described (reviewed in [64]). However, an increasing body of evidence indicates that macrophages and other myeloid cells express IL-17a [65–67]. Considering the pathophysiological significance of both IL-17a and macrophage recruitment in various conditions such as endometriosis, sepsis, and lung cancer [65,68,69], future research is warranted on the contribution of macrophage-derived IL-17a in these contexts. Additionally, both IL-17 and IFN- γ are known to drive CD13 upregulation [49,70,71]. Of note, TNF- α , IL-8, and MCP-1 were detected at concentrations ranging from 50 to 500 pg/mL, but they did not increase significantly after crosslinking CD13. Thus, it is highly likely that the secretion of these cytokines is the result of the conditions to which the cells are subjected during the incubations, namely, changes in temperature and mechanical stress.

Our findings suggest that CD13 and CR3 (CD11b/CD18) may collaborate in various cellular functions, including adhesion. CD13 has long been implicated in pro-adhesive events such as aggregation [72,73] and invasiveness [74], while CR3 (CD11b/CD18) is well-known for its adhesive properties and activation in response to the stimulation of other receptors. For example, CD11b activation triggered by human neutrophil antigen 3a auto-antibodies leads to neutrophil accumulation in the pulmonary microvasculature of some blood transfusion recipients, causing severe transfusion-related acute lung injury [75]. This suggests that CD13 and CR3 may participate in the same adhesion events during inflammation-related transendothelial migration. Although our group previously reported that CD13-mediated adhesion to endothelial cells is integrin-independent [28], it is important to note that CD11b was not among the integrins evaluated. This could partially explain the observation that CD13 ligation impairs transendothelial migration *in vivo* [28]. Given that, as we demonstrated, CD11b activation is a consequence of CD13 stimulation, persistent CD13 engagement would render active CR3 in constant contact with its endothelial ligands such as ICAM-1 and ICAM-2, JAM-A, JAM-C, and RAGE [9]. This continuous engagement could lead to cell arrest, polarization, and spreading, potentially inhibiting extravasation [76]. While it remains uncertain, our findings suggest that CD11b

may indeed contribute to this process. Further investigation is needed to confirm or rule out its involvement.

CD13 and CR3 may also collaborate in phagocytosis, as both receptors perform this cellular function. Licona-Limón and colleagues [3] demonstrated that CD13 is a primary phagocytic receptor, capable of mediating phagocytosis of CD13-directed phagocytic preys by human macrophages and THP-1 monocytes. Even when expressed in non-phagocytic HEK293 cells, CD13 enables them to internalize the same type of phagocytic particles. As for CR3, its involvement in the complement cascade is well-established. Activation of the complement system leads to the generation of opsonizing molecules like iC3b, which are recognized by CR3 to facilitate phagocytosis (reviewed in [8]). CR3-mediated phagocytosis can be synergistically enhanced by other receptors, such as CR1, CD14, and scavenger receptors, in the internalization of pathogens like *Francisella tularensis* [77], and *Borrelia burgdorferi* [78]. Considering that CD13 also acts as a co-receptor to other phagocytic receptors like FcγRs and mannose receptors [35,49], it is plausible that a similar functional interaction exists between CD13 and CR3, as it does between CD44 and CR3, where CD44-mediated phagocytosis triggers, and is partially dependent on, CD11b activation [79].

CD13 is overexpressed in many cancers, whereby adhesion and cell motility, a mechanistically closely related phenomenon, contribute decisively to tumor progression [80–82]. The peptidase activity of CD13 has long been implicated in the ability of myeloid leukemia cells to resist apoptosis. Professor Kiyohiko Hatake's research group at the Japanese Foundation of Cancer Research has dedicated decades to investigating this phenomenon and has reported that when leukemic cells attach to vascular endothelial cells, CD13 facilitates the degradation of the pro-apoptotic cytokine IL-8 produced by the endothelium [83,84]. Building on the findings presented in this study, we propose that CD13 plays a dual role in this process. Initially, it promotes the attachment of leukemic cells to the endothelium—a critical step in any metastatic cascade—by activating CR3 and potentially other adhesion molecules. Subsequently, its peptidase activity aids in cell survival by breaking down pro-apoptotic molecules secreted by the vasculature.

Therefore, future research should focus on understanding the functional impact of CD13 crosslinking on CR3-mediated adhesion and phagocytosis and identifying the specific functions that are coordinated by these receptors. It will also be necessary to assess the participation of other components of the proposed signaling pathway governing CD13-mediated CR3 activation and membrane expression both *in vitro* and, eventually, *in vivo*. One possible approach is to use a CRISPR-Cas9 screening strategy, disrupting the genes encoding the signaling pathway components individually in immortalized cells and subsequently expanding them into cell lines. This would enable the characterization of various aspects of the signaling pathway, including the timing of events and the consequences of the absence of each protein. Additionally, the phosphorylation at serine 8 and 10 in the cytoplasmic tail of CD13, which has not been reported yet, should be evaluated as it could add extra docking sites for accessory proteins. Such specifics could provide the basis for the design of therapies that inhibit or enhance particular cellular activities to prevent the spread of cancers in which CD13 is overexpressed.

5. Conclusions

In conclusion, the understanding of CD13 has evolved from being a leukemia marker to a co-receptor and a moonlighting enzyme. This study reveals that CD13 not only elicits outside-in signaling but also triggers inside-out signaling, leading to the activation and membrane expression of CR3 (CD11b/CD18), another immune receptor. These findings highlight the ability of CD13 to induce cell phenomena comparable to classical phagocytic receptors, despite the absence of canonical signaling motifs.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom13101488/s1>, Figure S1: Workflow; Figure S2: Rise in CD11b expression after differentiation of THP-1 monocytes into macrophages; Figure S3: CD13 crosslinking activates CR3 in human MDMs; Figure S4: The inhibition of Syk augments the activation of CR3 (CD11b/CD18) triggered by CD13 crosslinking on MDMs; Figure S5: The proportion of activated CD11b relative to its total membrane expression changes with PLC γ and Src inhibitors, but not with Syk or actin polymerization ones; Figure S6: Molecular ontology within the protein interaction network; Figure S7: 65 non-redundant proteins were deemed to be of interest after the interrogation of databases using CD13, Syk, and CR3 (CD11b/CD18) as queries; Figure S8: CD13 to CR3 inside-out signaling pathway; Table S1: Description of the 76 proteins contained in the CD13, CR3 (CD11b/CD18), and Syk interaction network [3,85–105].

Author Contributions: Conceptualization, L.D.-A., M.E.M.-S. and E.O.; data curation, L.D.-A.; formal analysis, L.D.-A.; investigation, L.D.-A. and E.P.-F.; methodology, L.D.-A., M.E.M.-S., E.P.-F. and E.O.; project administration, L.D.-A. and E.O.; resources, L.D.-A., M.E.M.-S., E.G., E.P.-F. and E.O.; supervision, M.E.M.-S. and E.O.; validation, L.D.-A., M.E.M.-S., E.G., E.P.-F. and E.O.; visualization, L.D.-A., M.E.M.-S., E.G., E.P.-F. and E.O.; writing—original draft, L.D.-A.; writing—review and editing, L.D.-A., M.E.M.-S., E.G., E.P.-F. and E.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología scholarship 399345 (L.D.-A.), the Engineering and Physical Sciences Research Council International Research Collaboration in Early-Warning Sensing Systems for Infectious Diseases (i-sense) EP/K031953/1. (E.G.), and PAPIIT-DGAPA-UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México) grant number IN208320 (L.D.-A. and E.O.).

Institutional Review Board Statement: This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available within this article and its supplementary material.

Acknowledgments: Laura Díaz-Alvarez received a fellowship from CONACYT, number 399345 (CVU 399546), and she thanks the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM for its support. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for Laura Díaz-Alvarez to obtain the PhD degree in the Posgrado en Ciencias Biológicas at the Universidad Nacional Autónoma de México. The authors thank the technical support from Claudia A. Garay-Canales and QFB Patricia Espinosa-Cueto with cell biology procedures and from Carlos Castellanos-Barba and the National Laboratory of Flow Cytometry (LabNalCit), Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM for assistance and advise with flow cytometry. The authors are also deeply grateful to Georgina López-Cortés, Marco A. Alfonzo-Mendez, and Bruce Alberts for their generous suggestions to improve the quality of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Riemann, D.; Kehlen, A.; Langner, J. CD13—Not just a marker in leukemia typing. *Immunol. Today* **1999**, *20*, 83–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Wong, A.H.M.; Zhou, D.; Rini, J.M. The X-ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 36804–36813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Licona-Limón, I.; Garay-Canales, C.A.; Muñoz-Paleta, O.; Ortega, E. CD13 mediates phagocytosis in human monocytic cells. *J. Leukoc. Biol.* **2015**, *98*, 85–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Garay-Canales, C.A.; Licona-Limón, I.; Ortega, E. Distinct Epitopes on CD13 Mediate Opposite Consequences for Cell Adhesion. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 4093435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Subramani, J.; Ghosh, M.; Rahman, M.M.; Caromile, L.A.; Gerber, C.; Rezaul, K.; Han, D.K.; Shapiro, L.H. Tyrosine Phosphorylation of CD13 Regulates Inflammatory Cell–Cell Adhesion and Monocyte Trafficking. *J. Immunol.* **2013**, *191*, 3905–3912. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Bednarczyk, M.; Stege, H.; Grabbe, S.; Bros, M. β 2 Integrins—Multi-Functional Leukocyte Receptors in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Bouti, P.; Webbers, S.D.S.; Fagerholm, S.C.; Alon, R.; Moser, M.; Matlung, H.L.; Kuijpers, T.W. β 2 Integrin Signaling Cascade in Neutrophils: More Than a Single Function. *Front. Immunol.* **2021**, *11*, 619925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Erdei, A.; Lukácsi, S.; Mácsik-Valent, B.; Nagy-Baló, Z.; Kurucz, I.; Bajtay, Z. Non-identical twins: Different faces of CR3 and CR4 in myeloid and lymphoid cells of mice and men. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2019**, *85*, 110–121. [[CrossRef](#)]
9. Sung, S. Co-immunostaining of ICAM-1, ICAM-2, and CD31 in Mouse Kidney Glomeruli. *Bio-Protocol* **2020**, *10*, e3663. [[CrossRef](#)]
10. Wen, L.; Marki, A.; Roy, P.; McArdle, S.; Sun, H.; Fan, Z.; Gingras, A.R.; Ginsberg, M.H.; Ley, K. Kindlin-3 recruitment to the plasma membrane precedes high-affinity β 2-integrin and neutrophil arrest from rolling. *Blood* **2021**, *137*, 29–38. [[CrossRef](#)]
11. Torres-Gomez, A.; Sanchez-Trincado, J.L.; Toribio, V.; Torres-Ruiz, R.; Rodríguez-Perales, S.; Yáñez-Mó, M.; Reche, P.A.; Cabañas, C.; Lafuente, E.M. RIAM-VASP Module Relays Integrin Complement Receptors in Outside-In Signaling Driving Particle Engulfment. *Cells* **2020**, *9*, 1166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Wang, D.; Guo, Q.; Wei, A.; Li, A. Differential Binding of Active and Inactive Integrin to Talin. *Protein J.* **2018**, *37*, 280–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Retta, S.F.; Balzac, F.; Avolio, M. Rap1: A turnabout for the crosstalk between cadherins and integrins. *Eur. J. Cell Biol.* **2006**, *85*, 283–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Xue, L.; Geahlen, R.L.; Tao, W.A. Identification of direct tyrosine kinase substrates based on protein kinase assay-linked phosphoproteomics. *Mol. Cell. Proteom.* **2013**, *12*, 2969–2980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Orsó, E.; Werner, T.; Wolf, Z.; Bandulik, S.; Kramer, W.; Schmitz, G. Ezetimib influences the expression of raft-associated antigens in human monocytes. *Cytom. Part A* **2006**, *69*, 206–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Martinez, V.J.; Asico, L.D.; Jose, P.A.; Tiu, A.C. Lipid rafts and dopamine receptor signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8909. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lingwood, D.; Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **2010**, *327*, 46–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Petty, H.R.; Worth, R.G.; Todd, R.F. Interactions of integrins with their partner proteins in leukocyte membranes. *Immunol. Res.* **2002**, *25*, 75–95. [[CrossRef](#)]
19. Jongstra-Bilen, J.; Harrison, R.; Grinstein, S. Fc γ -receptors Induce Mac-1 (CD11b/CD18) Mobilization and Accumulation in the Phagocytic Cup for Optimal Phagocytosis. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 45720–45729. [[CrossRef](#)]
20. Carrascal, M.A.; Silva, M.; Ferreira, J.A.; Azevedo, R.; Ferreira, D.; Silva, A.M.N.; Ligeiro, D.; Santos, L.L.; Sackstein, R.; Videira, P.A. A functional glycoproteomics approach identifies CD13 as a novel E-selectin ligand in breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Gen. Subj.* **2018**, *1862*, 2069–2080. [[CrossRef](#)]
21. Ghosh, M.; Lo, R.; Ivic, I.; Aguilera, B.; Qendro, V.; Devarakonda, C.; Shapiro, L.H. CD13 tethers the IQGAP1-ARF6-EFA6 complex to the plasma membrane to promote ARF6 activation, β 1 integrin recycling, and cell migration. *Sci. Signal.* **2019**, *12*, eaav5938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Shooshtari, P.; Fortuno, E.S.; Blimkie, D.; Yu, M.; Gupta, A.; Kollmann, T.R.; Brinkman, R.R. Correlation analysis of intracellular and secreted cytokines via the generalized integrated mean fluorescence intensity. *Cytom. Part A* **2010**, *77*, 873–880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Szklarczyk, D.; Gable, A.L.; Lyon, D.; Junge, A.; Wyder, S.; Huerta-Cepas, J.; Simonovic, M.; Doncheva, N.T.; Morris, J.H.; Bork, P.; et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D607–D613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. von Mering, C.; Jensen, L.J.; Snel, B.; Hooper, S.D.; Krupp, M.; Fogliarini, M.; Jouffre, N.; Huynen, M.A.; Bork, P. STRING: Known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, D433–D437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Stelzer, G.; Rosen, N.; Plaschkes, I.; Zimmerman, S.; Twik, M.; Fishilevich, S.; Stein, T.I.; Nudel, R.; Lieder, I.; Mazor, Y.; et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses. *Curr. Protoc. Bioinform.* **2016**, *54*, 1–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D8–D13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Santos, A.N.; Langner, J.; Herrmann, M.; Riemann, D. Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. *Cell. Immunol.* **2000**, *201*, 22–32. [[CrossRef](#)]
28. Mina-Osorio, P.; Winnicka, B.; O’Conor, C.; Grant, C.L.; Vogel, L.K.; Rodriguez-Pinto, D.; Holmes, K.V.; Ortega, E.; Shapiro, L.H. CD13 is a novel mediator of monocytic/endothelial cell adhesion. *J. Leukoc. Biol.* **2008**, *84*, 448–459. [[CrossRef](#)]
29. López-Cortés, G.I.; Díaz-Alvarez, L.; Ortega, E. Leukocyte Membrane Enzymes Play the Cell Adhesion Game. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 742292. [[CrossRef](#)]
30. Mazumder, A.; Shiao, S.; Haricharan, S. HER2 Activation and Endocrine Treatment Resistance in HER2-negative Breast Cancer. *Endocrinology* **2021**, *162*, bqab153. [[CrossRef](#)]
31. Hynes, R.O. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **2002**, *110*, 673–687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lefort, C.T.; Hyun, Y.-M.; Schultz, J.B.; Law, F.-Y.; Waugh, R.E.; Knauf, P.A.; Kim, M. Outside-In Signal Transmission by Conformational Changes in Integrin Mac-1. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 6460–6468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Harokopakis, E.; Hajishengallis, G. Integrin activation by bacterial fimbriae through a pathway involving CD14, Toll-like receptor 2, and phosphatidylinositol-3-kinase. *Eur. J. Immunol.* **2005**, *35*, 1201–1210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Han, C.; Jin, J.; Xu, S.; Liu, H.; Li, N.; Cao, X. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 734–742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mina-Osorio, P.; Ortega, E. Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγRs in human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* **2005**, *77*, 1008–1017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Pérez-Figueroa, E.; Álvarez-Carrasco, P.; Ortega, E. Crosslinking of membrane CD13 in human neutrophils mediates phagocytosis and production of reactive oxygen species, neutrophil extracellular traps and proinflammatory cytokines. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 6681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Martínez de Paz, A.; Zvi Josefowicz, S.; Alexia Martínez de Paz, C. Signaling-to-chromatin pathways in the immune system. *Immunol. Rev.* **2021**, *300*, 37–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Nuutila, J.; Jalava-Karvinen, P.; Hohenthal, U.; Laitinen, I.; Kotilainen, P.; Rajamäki, A.; Nikoskelainen, J.; Lilius, E.M. Comparison of degranulation of easily mobilizable intracellular granules by human phagocytes in healthy subjects and patients with infectious diseases. *Hum. Immunol.* **2009**, *70*, 813–819. [[CrossRef](#)]
39. Jang, J.-W.; Park, S.; Moon, E.-Y. Spleen tyrosine kinase regulates crosstalk of hypoxia-inducible factor-1α and nuclear factor (erythroid-derived)2-like 2 for B cell survival. *Int. Immunopharmacol.* **2021**, *95*, 107509. [[CrossRef](#)]
40. Sahan-Firat, S.; Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D.S.; Senol, S.P.; Sari, A.N.; Cil, M.; Unsal, D.; Korkmaz, B.; Tunctan, B.; Malik, K.U.; et al. NF-κB activation mediates LPS-or zymosan-induced hypotension and inflammation reversed by BAY61-3606, a selective Syk inhibitor, in rat models of septic and non-septic shock. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2019**, *46*, 173–182. [[CrossRef](#)]
41. Zheng, T.J.; Lofurno, E.R.; Melrose, A.R.; Lakshmanan, H.H.S.; Pang, J.; Phillips, K.G.; Fallon, M.E.; Kohs, T.C.; Ngo, A.T.; Shatzel, J.J.; et al. Assessment of the effects of Syk and BTK inhibitors on GPVI-mediated platelet signaling and function. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2021**, *320*, C902–C915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Saci, A.; Liu, W.Q.; Vidal, M.; Garbay, C.; Rendu, F.; Bachelot-Loza, C. Differential effect of the inhibition of Grb2-SH3 interactions in platelet activation induced by thrombin and by Fc receptor engagement. *Biochem. J.* **2002**, *363*, 717–725. [[CrossRef](#)]
43. Mina-Osorio, P.; Shapiro, L.H.; Ortega, E. CD13 in cell adhesion: Aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells. *J. Leukoc. Biol.* **2006**, *79*, 719–730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Torres-Gomez, A.; Cabañas, C.; Lafuente, E.M. Phagocytic Integrins: Activation and Signaling. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Mendoza-Coronel, E.; Ortega, E. Macrophage polarization modulates FcγR- and CD13-mediated phagocytosis and reactive oxygen species production, independently of receptor membrane expression. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 303. [[CrossRef](#)]
46. Kühlmann, U.C.; Chwieralski, C.E.; van den Brule, S.; Röcken, C.; Reinhold, D.; Welte, T.; Bühling, F. Modulation of cytokine production and silica-induced lung fibrosis by inhibitors of aminopeptidase N and of dipeptidyl peptidase-IV-related proteases. *Life Sci.* **2009**, *84*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kehlen, A.; Göhring, B.; Langner, J.; Riemann, D. Regulation of the expression of aminopeptidase A aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 in renal carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by cytokines and cAMP-increasing mediators. *Clin. Exp. Immunol.* **2001**, *111*, 435–441. [[CrossRef](#)]
48. Gabrilovac, J.; Breljak, D.; Čupić, B. Regulation of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2; APN; CD13) on the HL-60 cell line by TGF-β1. *Int. Immunopharmacol.* **2008**, *8*, 613–623. [[CrossRef](#)]
49. Gabrilovac, J.; Čupić, B.; Živković, E.; Horvat, L.; Majhen, D. Expression, regulation and functional activities of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2; APN; CD13) on murine macrophage J774 cell line. *Immunobiology* **2011**, *216*, 132–144. [[CrossRef](#)]
50. Villaseñor-Cardoso, M.I.; Frausto-Del-Río, D.A.; Ortega, E. Aminopeptidase N (CD13) Is involved in phagocytic processes in human dendritic cells and macrophages. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 562984. [[CrossRef](#)]
51. Shabir, K.; Gharanei, S.; Orton, S.; Patel, V.; Chauhan, P.; Karteris, E.; Randeve, H.S.; Brown, J.E.; Kyrou, I. Asprosin Exerts Pro-Inflammatory Effects in THP-1 Macrophages Mediated via the Toll-like Receptor 4 (TLR4) Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *24*, 227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Souissi, C.; Marzouki, S.; Elbini-Dhouib, I.; Jebali, J.; Oliveira, F.; Valenzuela, J.G.; Srairi-Abid, N.; Kamhawi, S.; Ben Ahmed, M. PpSP32, the Phlebotomus papatasi immunodominant salivary protein, exerts immunomodulatory effects on human monocytes, macrophages, and lymphocytes. *Parasit. Vectors* **2023**, *16*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Zhou, J.; Fang, F.; Qi, J.; Li, T.; Zhang, L.; Liu, H.; Lv, J.; Xu, T.; Wu, F.; Song, C.; et al. Activation of Nrf2 modulates protective immunity against Mycobacterium tuberculosis infection in THP1-derived macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* **2022**, *193*, 177–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Lee, A.J.; Ashkar, A.A. The dual nature of type I and type II interferons. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Gredmark, S.; Britt, W.B.; Xie, X.; Lindbom, L.; Söderberg-Nauclér, C. Human Cytomegalovirus Induces Inhibition of Macrophage Differentiation by Binding to Human Aminopeptidase N/CD13. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 4897–4907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Yeager, C.; Ashmun, R.; Williams, R.; Cardellichio, C.; Shapiro, L.; Look, T.; Holmes, K. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* **1992**, *357*, 420–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Yamaya, M.; Nishimura, H.; Deng, X.; Sugawara, M.; Watanabe, O.; Nomura, K.; Shimotai, Y.; Momma, H.; Ichinose, M.; Kawase, T. Inhibitory effects of glycopyrronium, formoterol, and budesonide on coronavirus HCoV-229E replication and cytokine production by primary cultures of human nasal and tracheal epithelial cells. *Respir. Investig.* **2020**, *58*, 155–168. [[CrossRef](#)]

58. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 133–146. [[CrossRef](#)]
59. Teng, M.W.L.; Bowman, E.P.; McElwee, J.J.; Smyth, M.J.; Casanova, J.L.; Cooper, A.M.; Cua, D.J. IL-12 and IL-23 cytokines: From discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 719–729. [[CrossRef](#)]
60. Vignali, D.A.A.; Kuchroo, V.K. IL-12 family cytokines: Immunological playmakers. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 722–728. [[CrossRef](#)]
61. Stanley, A.C.; Lieu, Z.Z.; Wall, A.A.; Venturato, J.; Khromykh, T.; Hamilton, N.A.; Gleeson, P.A.; Stow, J.L. Recycling endosome-dependent and -independent mechanisms for IL-10 secretion in LPS-activated macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **2012**, *92*, 1227–1239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Stow, J.L.; Murray, R.Z. Intracellular trafficking and secretion of inflammatory cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2013**, *24*, 227–239. [[CrossRef](#)]
63. Manderson, A.P.; Kay, J.G.; Hammond, L.A.; Brown, D.L.; Stow, J.L. Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNF α . *J. Cell Biol.* **2007**, *178*, 57–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Ge, Y.; Huang, M.; Yao, Y.M. Biology of Interleukin-17 and Its Pathophysiological Significance in Sepsis. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 548387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Hou, Y.; Zhu, L.; Tian, H.; Sun, H.X.; Wang, R.; Zhang, L.; Zhao, Y. IL-23-induced macrophage polarization and its pathological roles in mice with imiquimod-induced psoriasis. *Protein Cell* **2018**, *9*, 1027–1038. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Erbel, C.; Dengler, T.J.; Wangler, S.; Lasitschka, F.; Bea, F.; Wambsganss, N.; Hakimi, M.; Böckler, D.; Katus, H.A.; Gleissner, C.A. Expression of IL-17A in human atherosclerotic lesions is associated with increased inflammation and plaque vulnerability. *Basic Res. Cardiol.* **2011**, *106*, 125–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Bozinovski, S.; Seow, H.J.; Chan, S.P.J.; Anthony, D.; McQualter, J.; Hansen, M.; Jenkins, B.J.; Anderson, G.P.; Vlahos, R. Innate cellular sources of interleukin-17A regulate macrophage accumulation in cigarette- smoke-induced lung inflammation in mice. *Clin. Sci.* **2015**, *129*, 785–796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Miller, J.E.; Ahn, S.H.; Marks, R.M.; Monsanto, S.P.; Fazleabas, A.T.; Koti, M.; Tayade, C. IL-17A Modulates Peritoneal Macrophage Recruitment and M2 Polarization in Endometriosis. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 502823. [[CrossRef](#)]
69. Ferreira, N.; Mesquita, I.; Baltazar, F.; Silvestre, R.; Granja, S. IL-17A and IL-17F orchestrate macrophages to promote lung cancer. *Cell. Oncol.* **2020**, *43*, 643–654. [[CrossRef](#)]
70. Gabrilovac, J.; Breljak, D.; Čupić, B.; Ambriović-Ristov, A. Regulation of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2; APN; CD13) by interferon- γ on the HL-60 cell line. *Life Sci.* **2005**, *76*, 2681. [[CrossRef](#)]
71. Morgan, R.L.; Behbahani-Nejad, N.; Endres, J.; Amin, M.A.; Lepore, N.J.; Du, Y.; Urquhart, A.; Chung, K.C.; Fox, D.A. Localization, Shedding, Regulation and Function of Aminopeptidase N/CD13 on Fibroblast like Synoviocytes. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0162008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Mina-Osorio, P.; Soto-Cruz, I.; Ortega, E. A role for galectin-3 in CD13-mediated homotypic aggregation of monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *353*, 605–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Fiddler, C.A.; Parfrey, H.; Cowburn, A.S.; Luo, D.; Nash, G.B.; Murphy, G.; Chilvers, E.R. The aminopeptidase CD13 induces homotypic aggregation in neutrophils and impairs collagen invasion. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0160108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Kido, A.; Krueger, S.; Haekkel, C.; Roessner, A. Inhibitory effect of antisense aminopeptidase N (APN/CD13) cDNA transfection on the invasive potential of osteosarcoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* **2003**, *20*, 585–592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Berthold, T.; Glaubitz, M.; Muschter, S.; Groß, S.; Palankar, R.; Reil, A.; Helm, C.A.; Bakchoul, T.; Schwertz, H.; Bux, J.; et al. Human neutrophil antigen-3a antibodies induce neutrophil stiffening and conformational activation of CD11b without shedding of L-selectin. *Transfusion* **2015**, *55*, 2939–2948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Li, N.; Yang, H.; Wang, M.; Lü, S.; Zhang, Y.; Long, M. Ligand-specific binding forces of LFA-1 and Mac-1 in neutrophil adhesion and crawling. *Mol. Biol. Cell* **2018**, *29*, 408–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Schwartz, J.T.; Barker, J.H.; Long, M.E.; Kaufman, J.; McCracken, J.; Allen, L.-A.H. Natural IgM Mediates Complement-Dependent Uptake of Francisella tularensis by Human Neutrophils via Complement Receptors 1 and 3 in Nonimmune Serum. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 3064–3077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Gonzalez, A.C.; Barriales, D.; Palacios, A.; Montesinos-Robledo, M.; Navasa, N.; Azkargorta, M.; Peña-Cearra, A.; Tomás-Cortázar, J.; Escobes, I.; Pascual-Itoiz, M.A.; et al. Regulation of macrophage activity by surface receptors contained within Borrelia burgdorferi-enriched phagosomal fractions. *PLoS Pathog.* **2019**, *15*, e1008163. [[CrossRef](#)]
79. Vachon, E.; Martin, R.; Kwok, V.; Cherepanov, V.; Chow, C.W.; Doerschuk, C.M.; Plumb, J.; Grinstein, S.; Downey, G.P. CD44-mediated phagocytosis induces inside-out activation of complement receptor-3 in murine macrophages. *Blood* **2007**, *110*, 4492–4502. [[CrossRef](#)]
80. Tokuhara, T.; Hattori, N.; Ishida, H.; Hirai, T.; Higashiyama, M.; Kodama, K.; Miyake, M. Clinical Significance of Aminopeptidase N in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 3971–3978. [[CrossRef](#)]
81. Piedfer, M.; Dauzonne, D.; Tang, R.; N’Guyen, J.; Billard, C.; Bauvois, B. Aminopeptidase-N/CD13 is a potential proapoptotic target in human myeloid tumor cells. *FASEB J.* **2011**, *25*, 2831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Hashida, H.; Takabayashi, A.; Kanai, M.; Adachi, M.; Kondo, K.; Kohno, N.; Yamaoka, Y.; Miyake, M. Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: Its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology* **2002**, *122*, 376–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

83. Mishima, Y.; Terui, Y.; Sugimura, N.; Matsumoto-Mishima, Y.; Rokudai, A.; Kuniyoshi, R.; Hatake, K. Continuous treatment of bestatin induces anti-angiogenic property in endothelial cells. *Cancer Sci.* **2007**, *98*, 364–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Mishima, Y.; Matsumoto-Mishima, Y.; Terui, Y.; Katsuyama, M.; Yamada, M.; Mori, M.; Ishizaka, Y.; Ikeda, K.; Watanabe, J.I.; Mizunuma, N.; et al. Leukemic Cell-Surface CD13/Aminopeptidase N and Resistance to Apoptosis Mediated by Endothelial Cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **2002**, *94*, 1020–1028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Mina-Osorio, P. The moonlighting enzyme CD13: Old and new functions to target. *Trends Mol. Med.* **2008**, *14*, 361–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Fernandes, R.A.; Su, L.; Nishiga, Y.; Ren, J.; Bhuiyan, A.M.; Cheng, N.; Kuo, C.J.; Picton, L.K.; Ohtsuki, S.; Majzner, R.G.; et al. Immune receptor inhibition through enforced phosphatase recruitment. *Nature* **2020**, *586*, 779–784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Zeke, A.; Misheva, M.; Reményi, A.; Bogoyevitch, M.A. JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2016**, *80*, 793–835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Meier, T.I.; Cook, J.A.; Thomas, J.E.; Radding, J.A.; Horn, C.; Lingaraj, T.; Smith, M.C. Cloning, expression, purification, and characterization of the human Class Ia phosphoinositide 3-kinase isoforms. *Protein Expr. Purif.* **2004**, *35*, 218–224. [[CrossRef](#)]
89. Guyot, B.; Mouchiroud, G. Characterization of promoter elements directing Mona/Gads molecular adapter expression in T and myelomonocytic cells: Involvement of the AML-1 transcription factor. *J. Leukoc. Biol.* **2003**, *73*, 263–272. [[CrossRef](#)]
90. Oda, A.; Ochs, H.D.; Lasky, L.A.; Spencer, S.; Ozaki, K.; Fujihara, M.; Handa, M.; Ikebuchi, K.; Ikeda, H. CrkL is an adapter for Wiskott-Aldrich syndrome protein and Syk. *Blood* **2001**, *97*, 2633–2639. [[CrossRef](#)]
91. Shi, X.; Pan, S.; Li, Y.; Ma, W.; Wang, H.; Xu, C.; Li, L. Xanthoplanine attenuates macrophage polarization towards M1 and inflammation response via disruption of CrkL-STAT5 complex. *Arch. Biochem. Biophys.* **2020**, *683*, 108325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Plataniias, L.C.; Uddin, S.; Bruno, E.; Korkmaz, M.; Ahmad, S.; Alsayed, Y.; van den Berg, D.; Druker, B.J.; Wickrema, A.; Hoffman, R. CrkL and CrkII participate in the generation of the growth inhibitory effects of interferons on primary hematopoietic progenitors. *Exp. Hematol.* **1999**, *27*, 1315–1321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Kataoka, T.R.; Kumanogoh, A.; Bandara, G.; Metcalfe, D.D.; Gilfillan, A.M. CD72 Negatively Regulates KIT-Mediated Responses in Human Mast Cells. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 2468–2475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Cui, Y.; Zhou, F.; Bai, H.; Wei, L.; Tan, J.; Zeng, Z.; Song, Q.; Chen, J.; Huang, N. Real-time QCM-D monitoring of endothelial cells and macrophages adhering and spreading to SEMA4D/heparin surfaces. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *171*, 522–529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Galuppo, M.K.; de Rezende, E.; Forti, F.L.; Cortez, M.; Cruz, M.C.; Teixeira, A.A.; Giordano, R.J.; Stolf, B.S. CD100/Sema4D increases macrophage infection by Leishmania (Leishmania) amazonensis in a CD72 dependent manner. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Irizarry-Caro, R.A.; McDaniel, M.M.; Overcast, G.R.; Jain, V.G.; Troutman, T.D.; Pasare, C. TLR signaling adapter BCAP regulates inflammatory to reparatory macrophage transition by promoting histone lactylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 30628–30638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Miao, Y.; Jiang, M.; Qi, L.; Yang, D.; Xiao, W.; Fang, F. BCAP Regulates Dendritic Cell Maturation Through the Dual-Regulation of NF- κ B and PI3K/AKT Signaling During Infection. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Troutman, T.D.; Hu, W.; Fulechek, S.; Yamazaki, T.; Kurosaki, T.; Bazand, J.F.; Pasare, C. Role for B-cell adapter for PI3K (BCAP) as a signaling adapter linking Toll-like receptors (TLRs) to serine/threonine kinases PI3K/Akt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 273–278. [[CrossRef](#)]
99. Lőrincz, Á.M.; Szeifert, V.; Bartos, B.; Szombath, D.; Mócsai, A.; Ligeti, E. Different Calcium and Src Family Kinase Signaling in Mac-1 Dependent Phagocytosis and Extracellular Vesicle Generation. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2942. [[CrossRef](#)]
100. Teitelbaum, S.L. The osteoclast and its unique cytoskeleton. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, *1240*, 14–17. [[CrossRef](#)]
101. Hedl, M.; Sun, R.; Huang, C.; Abraham, C. STAT3 and STAT5 Signaling Thresholds Determine Distinct Regulation for Innate Receptor-Induced Inflammatory Cytokines, and STAT3 / STAT5 Disease Variants Modulate These Outcomes. *J. Immunol.* **2019**, *203*, 3325–3338. [[CrossRef](#)]
102. Hyduk, S.J.; Rullo, J.; Cano, A.P.; Xiao, H.; Chen, M.; Moser, M.; Cybulsky, M.I. Talin-1 and Kindlin-3 Regulate α 4 β 1 Integrin-Mediated Adhesion Stabilization, but Not G Protein-Coupled Receptor-Induced Affinity Upregulation. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 4360–4368. [[CrossRef](#)]
103. Kim, M.; Carman, C.V.; Springer, T.A. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* **2003**, *301*, 1720–1725. [[CrossRef](#)]
104. Lim, J.; Thompson, J.; May, R.C.; Hotchin, N.A.; Caron, E. Regulator of G-Protein Signalling-14 (RGS14) Regulates the Activation of α M β 2 Integrin during Phagocytosis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e69163. [[CrossRef](#)]
105. Senetar, M.A.; McCann, R.O. Gene duplication and functional divergence during evolution of the cytoskeletal linker protein talin. *Gene* **2005**, *362*, 141–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.