



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**  
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

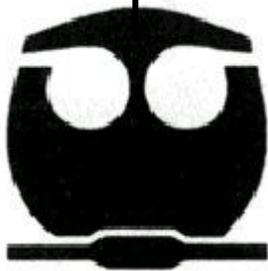
ASOCIACIÓN DE SYK Y SHP-1 EN  
CÉLULAS MONOCÍTICAS HUMANAS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :  
LINDA BENITA NÚÑEZ GARCÍA

Tutor: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO



MÉXICO, D. F.

Marzo 2008



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.

# ASOCIACIÓN DE SYK Y SHP-1 EN CÉLULAS MONOCÍTICAS HUMANAS

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Enrique Ortega Soto, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Enrique Ortega Soto	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. María Elena Ibarra Rubio	Facultad de Química, UNAM
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Raul Ambriz, del Banco de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI, que nos proporcionaron los concentrados leucocitarios de donadores voluntarios.

Se reconoce la asesoría técnica de la M. en IBB Claudia A. Garay Canales en los experimentos de obtención de monocitos humanos de sangre periférica.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (45092) y DGAPA-UNAM (IN220705). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día      de Marzo del 2008.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dra. Gloria Soldevila Melgarejo	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Dra. María Elena Ibarra Rubio	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Arturo Zenteno Galindo	Facultad de Medicina, UNAM

## AGRADECIMIENTOS

*A mi familia por el apoyo recibido, Grecia, Ariadna, Lucy y Félix, a Víctor, a mi papá que siempre me ha brindado su apoyo. A mi mamá que aunque ya no este presente físicamente, la llevo siempre en mi corazón. A mis tíos Martina y Armando por apoyarme siempre.*

*A todos los miembros del laboratorio que estuvieron conmigo: el Dr. Enrique por su apoyo y paciencia, a Claudia por su ayuda y sus siempre buenos consejos, a Aurora por hacerme reír de sus malos pensamientos, la Dra. Isabel por su apoyo y consejos, a los nuevos compañeros del laboratorio, por mantener ameno el ambiente dentro del lab, Mariana, Rodrigo y Natalia.*

*A mis amigos: Ale, Casandra, Oswaldo, Oralia, Francisco, Isaac que me estuvieron apoyando, criticando, conviviendo.*

*A todos mis compañeros de la maestría ... Sabina, Gerardo, Lizzet  
A Rafael por apoyarme e insistirme siempre ...*

*Por sus buenos consejos a Víctor, Juan, Alejandro, Roberto, y finalmente a todos aquellos que se me olvidó mencionar.*

# CONTENIDO

Reconocimientos	i
Agradecimientos	ii
Contenido	iv
Índice de figuras	vi
Índice de tablas	vi
<b>RESUMEN</b>	1
<b>Capítulo 1</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Origen y heterogeneidad de los monocitos-macrófagos	3
1.2 Activación de los monocitos-macrófagos	6
1.3 Receptores de superficie de monocitos-macrófagos	10
1.4 Receptores para inmunoglobulina G	13
1.5 Rutas de señalización iniciada por la agregación de los receptores Fc $\gamma$	14
1.5.1 Inhibición de la señalización por ITAMs	19
1.5.2 Regulación de la activación mediada por Fc $\gamma$ Rs	20
1.6 Cinasa de residuos de tirosina Syk	21
1.7 Fosfatasa de residuos de tirosina SHP-1	22
1.8 La proteína adaptadora Grb2	26
1.9 La adaptadora Cbl	27
<b>Capítulo 2</b>	
<b>ANTECEDENTES</b>	29
2.1 La vitamina D3 como inductor de diferenciación en células monocíticas	30
2.2 Planteamiento del problema	32
<b>Capítulo 3</b>	
<b>HIPÓTESIS</b>	34
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	34
3.1 Objetivos particulares	34
3.2 Metas	35
<b>Capítulo 4</b>	
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
4.1 Anticuerpos y reactivos	36
4.2 Obtención de monocitos humanos a partir de sangre periférica	36
4.3 Cultivo celular y diferenciación in vitro con vitamina D3	37
4.4 Estimulación celular e inmunoprecipitación	37
4.5 Inmunoblots	38
4.6 Tinción de plata	39
4.7 Ensayo de inmunofluorescencia	39
<b>Capítulo 5</b>	
<b>RESULTADOS</b>	
5.1 El tratamiento con VD3 induce la diferenciación de células THP-1 y MHSP	41
5.2 Syk se fosforila tras la agregación de los receptores Fc $\gamma$ RI o Fc $\gamma$ RII	46
5.3 El tratamiento con VD3 en células THP-1 no modifica la expresión de Syk y	

SHP-1.....	49
5.4 Nivel de fosforilación de Syk y su asociación con SHP-1 tras la agregación del Fc $\gamma$ RI en las células THP-1 tratadas con VD3.....	50
5.5 El nivel de fosforilación de Syk disminuye el nivel de asociación de SHP-1 con Syk aumenta cuando es agregado el Fc $\gamma$ RII en las células THP-1 tratadas con VD3.....	53
5.6 El nivel de expresión de las moléculas adaptadoras Cbl y Grb2 no cambia en células THP-1 tratadas con VD3.....	55
5.7 Cbl y Grb2 están asociadas a Syk en células THP-1 y el nivel de asociación no cambia en células estimuladas a través del Fc $\gamma$ RII.....	55
5.8 Nivel de fosforilación de Syk y la asociación de SHP-1 en MHSP tratados con VD3.....	60
<b>Capítulo 6</b>	
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>63</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
Abreviaturas.....	72
Referencias.....	73

## Índice de figuras

Fig 1.1	Transducción de señales activatorias tras la agregación de los receptores Fcγ.	18
Fig 1.2	Transducción de señales inhibitorias que se dan tras la agregación de los receptores Fcγ.	20
Fig 2.1	Mecanismo de acción de la VD3.	31
Fig 5.1	Análisis por citometría de flujo de la expresión de los receptores CD14, CR3 (CD11b), FcγRI (CD64) y FcγRII (CD32) en células THP-1.	42
Fig 5.2	Análisis por citometría de flujo de la expresión de los receptores CD14, CR3 (CD11b), FcγRI (CD64) y FcγRII (CD32) en MHSP.	43
Fig 5.3	Nivel de expresión de los receptores CD14, CR3, FcγRI y FcγRII en células THP-1.	44
Fig 5.4	Nivel de expresión de los receptores CD14, CR3, FcγRI y FcγRII en MHSP	45
Fig. 5.5	Determinación de fosforilación de Syk en inmunoblots de lisados de células estimuladas a diferentes tiempos a través del receptor FcγRI y FcγRII.	48
Fig 5.6	Tinción de plata de un gel de poliacrilamida de la inmunoprecipitación de Syk.	49
Fig 5.7	Nivel de expresión de Syk, SHP-1 y actina en células THP-1 durante el tratamiento con VD3 por 0, 24, 48 y 72 horas.	50
Fig 5.8	Nivel de fosforilación de Syk, y nivel de asociación de SHP-1 con Syk de células THP-1 durante el tratamiento con VD3 por 0, 24, 48 y 72 horas y estimuladas a través de FcγRI.	52
Fig 5.9	Nivel de fosforilación de Syk, y nivel de asociación de SHP-1 con Syk de células THP-1 durante el tratamiento con VD3 por 0, 24, 48 y 72 horas y estimuladas a través de FcγRII.	54
Fig. 5.10	Nivel de expresión de Cbl y Grb2 en células THP-1 durante el tratamiento con VD3.	56
Fig 5.11	Nivel de asociación de Cbl y Grb2 con Syk en células THP-1 durante el tratamiento con VD3 por 0, 24, 48 y 72 horas y estimuladas a través del FcγRI y FcγRII.	58
Fig 6.1	Complejos de señalización propuestos que se forman tras la agregación de los receptores FcγRs.	69

## Índice de tablas

Tabla 1.1	Funciones de algunos tipos de células del linaje de monocitos/macrófagos.	6
Tabla 1.2	Polarización en la activación de los macrófagos.	9
Tabla 1.3	Citocinas y moléculas efectoras producidas por monocitos/macrófagos.	11
Tabla 1.4	Algunos receptores de macrófagos (MΦ's), sus ligandos y funciones.	12
Tabla 1.5	Receptores para IgG.	16
Tabla 1.6	Proteínas que participan en la señalización de los receptores Fcγ: Syk, SHP-1, Cbl y Grb2.	24
<i>Tabla 5.1</i>	<i>Se indican los valores correspondientes al nivel de fosforilación de Syk y nivel de asociación de SHP-1 con Syk.</i>	62

## **RESUMEN**

Los monocitos y macrófagos expresan receptores para la inmunoglobulina G (Fc $\gamma$ Rs), los cuales tras su agregación por complejos inmunes inician una serie de eventos bioquímicos intracelulares que son necesarios para la inducción de la fagocitosis y otras funciones efectoras. Dado que los Fc $\gamma$ Rs tienen un número relativamente alto de isoformas, y que parecen mediar las mismas funciones, aún no se tiene claro si la señalización a través de cada isoforma de receptores Fc $\gamma$ R es siempre la misma, o depende de factores presentes en el medio extracelular (citocinas) o del fenotipo (estado de diferenciación) de la célula, considerando que *in vivo* existe una gran heterogeneidad de monocitos/macrófagos en diferentes etapas de diferenciación y activación.

Syk, una cinasa de residuos de tirosina es una de las primeras proteínas en ser activadas tras la agregación de los Fc $\gamma$ Rs y su activación es esencial para la transducción de señales por estos distintos receptores.

En el presente trabajo se comparó la señalización a través del Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII en células monocíticas de la línea THP-1 diferenciadas o no con 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D3 (VD3). Se observó que en las células THP-1 no diferenciadas, la agregación del Fc $\gamma$ RI o del Fc $\gamma$ RII induce un aumento significativo (de 2.3 y 1.5 veces respectivamente) en la fosforilación de Syk. En las células THP-1 diferenciadas por 72 horas con VD3, la agregación del Fc $\gamma$ RI no induce cambios en el nivel de fosforilación de Syk pero la agregación del Fc $\gamma$ RII induce una disminución significativa. Estos cambios se relacionaron con cambios en la asociación de la fosfatasa de residuos de tirosina SHP-1 con Syk tras las agregación del Fc $\gamma$ RII en las células THP-1 diferenciadas. También se observó que Cbl, una proteína adaptadora y con actividad de ligasa de ubiquitina, y Grb2, otra molécula adaptadora, están presentes complejos de señalización que incluyen a Syk. La agregación de los Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII no tiene cambios significativos en la asociación de Cbl-Syk. En células THP-1 diferenciadas por 72 horas con VD3 la asociación Cbl-Syk decrece significativamente respecto a las células no

diferenciadas, y mientras que tras la agregación del Fc $\gamma$ RI la asociación permanece como en los niveles basales, tras agregación del Fc $\gamma$ RII aumenta 1.3 veces. En cambio, Grb2 pierde su asociación con Syk tras la agregación del Fc $\gamma$ RI. Estas observaciones indican que SHP-1 se asocia con Syk pudiendo estar regulando su activación, ya que la puede estar desfosforilando por su actividad de fosfatasa, todo esto tras la agregación del Fc $\gamma$ RII en células THP-1 diferenciadas con VD3. Cbl y Grb2 forman parte de este complejo de señalización con Syk y SHP-1, y tras la agregación del Fc $\gamma$ RI se pierde la asociación de Grb2 con el complejo formado, pero no tras la agregación del Fc $\gamma$ RII. Experimentos similares se realizaron en monocitos humanos obtenidos de sangre periférica y diferenciados con VD3. Se encontró una gran variabilidad en la fosforilación basal de Syk, así como en la asociación de Syk con SHP-1, indicando una capacidad diferente de respuesta entre individuos.

## **Capítulo 1**

# **INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Origen y heterogeneidad de los macrófagos**

Los macrófagos y sus precursores en sangre los monocitos, forman parte de las primeras barreras de defensa contra las infecciones por microorganismos. Entre las principales funciones de un macrófago en la inmunidad adaptativa e innata están: la fagocitosis y degradación de células apoptóticas, microorganismos y células neoplásicas, la producción y secreción de citocinas, quimiocinas y otros mediadores solubles, así como la presentación de antígenos a linfocitos T.

El conjunto formado por los precursores de médula ósea, los monocitos en circulación y los macrófagos tisulares, se engloban bajo la denominación de Sistema Fagocítico Mononuclear (Imhof et al, 2004). Al igual que todas las células sanguíneas, estas células se originan en la médula ósea a partir de precursores hematopoyéticos (Boltz et al, 1995). Del precursor mielóide común se origina el progenitor de monocitos y granulocitos, el cual se diferencia al precursor de monocitos; este, a su vez, se diferencia a monoblasto, que finalmente se diferencia a promonocito (Imhof y Dunon, 1995). El promonocito es la primera célula morfológicamente identificable como precursora de los macrófagos. Por división del promonocito y su posterior diferenciación, surgen los monocitos que pasan de médula ósea al torrente sanguíneo, en donde representan entre el 1% y 6% de todas las células sanguíneas nucleadas. Hay citocinas que son determinantes para el crecimiento y diferenciación de este linaje celular, como el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). El proceso de diferenciación y maduración lleva a la inducción de un fenotipo específico de monocito que puede ser modificado por activación (Ancuta et al, 2003).

Los macrófagos pueden presentar diferentes estados funcionales: macrófagos residentes, inflamatorios y activados. En ausencia de un estímulo inflamatorio, varias quimiocinas y moléculas de adhesión regulan la migración de

los precursores de macrófagos y células dendríticas a tejidos periféricos (Grage et al, 2001). Estas quimiocinas son producidas y secretadas por células endoteliales, leucocitos o células estromales. Las quimiocinas se unen a proteoglicanos en la superficie de las células endoteliales. La interacción de la quimiocina con su receptor induce una rápida activación y señalización a través de diferentes tipos de segundos mensajeros. Entre las moléculas que participan en la trans migración, se han descrito la quimiocina CXCL14, las integrinas  $\beta 2$  de los leucocitos las cuales interactúan con ligandos como ICAM1 (molécula de adhesión intercelular 1), y las moléculas de adhesión de las uniones (JAM1 y JAMC) las cuales controlan la migración de células de la sangre a través del endotelio, el intersticio y el epitelio. También participan moléculas de la superfamilia de inmunoglobulinas (como CD31) y selectinas. Citocinas como el factor transformante  $\beta$ , quimiocinas y factores de crecimiento, siempre unidos a proteoglicanos, influyen la expresión de un amplio rango de genes cuyos productos contribuyen a la migración constitutiva de los monocitos. Las señales responsables del fenotipo específico incluyen productos secretorios y de superficie de células cercanas y de la matriz extracelular. Los macrófagos tisulares recién llegados del torrente sanguíneo sobreviven de 2 a 4 meses aproximadamente, y son aún células con gran capacidad de diferenciación, pues todavía no han alcanzado la madurez de sus capacidades funcionales (Turpin, 1993).

En años recientes ha sido posible definir dos subtipos de monocitos en circulación: los  $CD14^{hi}/CD16^{-}$ , llamados monocitos clásicos porque su fenotipo concuerda con la descripción original de monocito, tienen un nivel elevado de expresión del receptor CCR2, bajos niveles de CCR5 y niveles intermedios de Cx3CR1 (receptor 1 de quimiocinas CX3C); también tiene una alta expresión de moléculas de adhesión involucradas en el reclutamiento de leucocitos hacia sitios de reacción inflamatoria. El otro subtipo corresponde a monocitos  $CD14^{+}/CD16^{+}$  que tienen alta expresión de moléculas MHCII (complejo principal de histocompatibilidad de antígenos de clase II) así como de CD32, expresan niveles altos de los receptores CX3CR1, CCR5, CCR3 y son capaces de migrar transendotelialmente, tienen un fenotipo semejante a los macrófagos (Grage et al,

2000). Se pueden encontrar homólogos de estos dos subtipos de monocitos en varias especies de mamíferos. En presencia de IL-4 y GM-CSF, ambos tipos de monocitos pueden diferenciarse a células dendríticas. Se ha reportado un subtipo adicional de monocitos, el cual es CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>/CD64<sup>+</sup>, que tiene una alta expresión de CD86 y moléculas MHCII, una alta actividad estimuladora de linfocitos T, así como una alta capacidad fagocítica, semejante a la de CD14<sup>hi</sup>/CD16<sup>-</sup>, y produce grandes cantidades de citocinas. Este subtipo adicional de monocitos tiene una gran actividad estimuladora en la reacción mixta de leucocitos, como los monocitos CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>/CD64<sup>-</sup>; ellos representan un intermediario entre los monocitos y las células dendríticas. Aún no está claro en qué punto del proceso de diferenciación surgen estos subtipos de monocitos (Gordon y Taylor, 2005).

En la tabla 1.1 se mencionan algunos de los tipos principales de macrófagos que encontramos en los diferentes tejidos. Los macrófagos que se encuentran en la epidermis son llamados células de Langerhans; se desconoce su precursor, pero bajo condiciones de estrés provienen de monocitos del tipo inflamatorio. Se ha sugerido que los precursores de los osteoclastos son monocitos maduros de sangre periférica que expresan el receptor para M-CSF, aunque esto no se ha demostrado *in vivo*. Se piensa que el precursor de los macrófagos alveolares es reclutado de la sangre y que tiene una etapa de proliferación *in situ* para después diferenciarse a macrófago. En el Sistema Nervioso Central (SNC) encontramos varios subtipos de macrófagos: la microglia, macrófagos perivasculares, meningeos y del plexo coroideo. Hay también varios subtipos de macrófagos esplénicos: de la pulpa blanca, de la zona marginal y metalofílicos. La proliferación local contribuye a la repoblación de los macrófagos esplénicos y su precursor es de origen desconocido. En el hígado se encuentran las células de Kupffer, parte de ellas tienen su origen en la proliferación *in situ* de su precursor, el cual proviene de médula ósea (Turpin et al, 1993).

En respuesta a varios estímulos inflamatorios o inmunes; hay un aumento en el reclutamiento de monocitos y de precursores de médula ósea, que tiene como resultado la acumulación de macrófagos en el tejido.

**Tabla 1.1 Funciones de algunos tipos de células del linaje de monocitos/macrófagos** (Turpin et al, 1993).

Órgano/tejido	Células	Funciones
Médula ósea	Monocitos y precursores de monocitos	Control de la hematopoyesis por secreción de CSF-M, GM-CSF. Fagocitosis de partículas extrañas
S.N.C.	Microglía y macrófagos del cerebro	Fagocitosis de partículas, reparación de heridas.
Hígado	Células de Kupffer	Fagocitosis de partículas y endotoxinas. Mediar la respuesta inmunológica en la fase aguda después de algún daño o malignidad por la producción de IL-6
Pulmón	Macrófagos alveolares	Sistema inmune respiratorio y fagocitosis de partículas
Piel	Células de Langerhans	Presentación de antígenos, queratinización, secreción de prostaglandina E
Hueso	Osteoclastos	Metabolismo de calcio y secreción-reabsorción de la hormona paratiroidea
Linfoide	Macrófagos del tejido conectivo	Reacción inmune celular, humoral y fagocitosis de partículas
Bazo	Macrófagos esplénicos, de la zona marginal, de la pulpa blanca.	Eritroleucofagocitosis, fagocitosis de partículas, homeostasis del yodo y reacciones inmunes.

Los macrófagos derivados de monocitos bajo condiciones de inflamación, son activados por múltiples moléculas como IFN- $\gamma$ , LPS, IL-4, IL-13, etc. Dependiendo del estímulo, adquieren un fenotipo diferente. Pueden aumentar su expresión del complejo principal de histocompatibilidad de antígenos de clase II (MCH-II), su actividad citotóxica o su actividad endocítica. También encontramos un fenotipo que suprime la inflamación y promueve la reparación de tejidos al ser estimulado por IL-10 o TGF- $\beta$ . Estas distintas formas de activación las veremos en la siguiente sección.

### **1.2 Activación de monocitos/macrófagos**

En el curso de una reacción inflamatoria, los mecanismos pro-inflamatorios son los que garantizan la eliminación de los agentes que causan la infección, toxicidad o alergia. Pero también es importante la temporalidad de la reacción, ya que se necesita regular de manera negativa la inflamación, la

tolerancia y la inmunidad para asegurar la curación de la zona afectada. Por lo tanto es crucial asegurar el balance entre las reacciones inmunes pro-inflamatorias y anti-inflamatorias mediante mecanismos de activación clásicos y alternos de los monocitos-macrófagos (Goerdet et al, 1999).

Los principales eventos en el proceso inflamatorio ocurren de la siguiente manera: primero hay un incremento en el suministro sanguíneo al área afectada, el cual causa el enrojecimiento y calor; después hay un incremento en la permeabilidad capilar, la cual causa una mayor infiltración de las células sanguíneas a través de los vasos capilares hacia los tejidos causando inflamación y dolor. En las primeras horas hay un aumento en la migración de células blancas de la sangre, predominantemente neutrófilos, hacia el sitio de inflamación, seguido por el arribo de macrófagos entre las 16 y 48 horas. Los macrófagos ayudan a retirar las células muertas del área por fagocitosis y de esta manera se restablecen los tejidos. Si el proceso de inflamación es prolongado, el daño a los tejidos persiste y se hace más extensa la zona en donde se está llevando a cabo el proceso inflamatorio, pudiendo llegar a ser de tipo crónico (Lamoureux y Bradley, 2007).

En la activación innata un agente microbiano es reconocido por los macrófagos a través de receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, como los TLR's y CD14 (receptor de lipopolisacárido, LPS) y un amplio rango de receptores no opsónicos (Medzhitov y Janeway, 2000). Estos estímulos inducen la producción de citocinas pro-inflamatorias como  $IFN\alpha/\beta$ , y especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico, seguida por una respuesta anti-inflamatoria regulada. Un incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras en superficie favorece la presentación de antígeno. Los receptores "scavenger-A" y el receptor de manosa favorecen la fagocitosis de ligandos exógenos y propios (Gordon, 2003).

La ruta de activación llamada clásica es mediada por un primer contacto con  $IFN-\gamma$ , seguido por un segundo contacto de tipo microbiano, como LPS; los macrófagos activados por esta vía son designados como M1. Los macrófagos

activados por la activación clásica secretan IL-12, la cual favorece la diferenciación de células T naive a Th1.

La activación alterna es mediada por IL-4 e IL-13 actuando a través de su receptor; los macrófagos que son activados por esta vía son llamados macrófagos M2. Esta forma de activación incluye a los macrófagos expuestos a IL-4, IL-13, complejos inmunes, IL-10, glucocorticoides u hormonas esteroideas. Un miembro de la familia de TGF- $\beta$ , activina-A así como la IL-21 han mostrado recientemente inducir también la activación tipo M2 (Mantovani et al, 2007). Gordon y colaboradores introdujeron el concepto de activación alterna, y Goerdts y colaboradores mostraron que este tipo de activación preferencialmente ocurre en condiciones inflamatorias crónicas, como en la artritis reumatoide y la psoriasis. Los macrófagos alveolares y placentarios son un típico ejemplo de que la activación alterna ocurre de manera natural. La IL-4 y la IL-13 están asociadas a una respuesta tipo Th2. In vitro, IL-4 induce en macrófagos de peritoneo de ratón la expresión de MHCII lo cual estimula la endocitosis y presentación de antígeno, y ello induce la expresión selectiva de quimiocinas como CCL22, CCL17, y enzimas intracelulares como arginasa, que está implicada en el reclutamiento y formación de granulomas, también incrementa los niveles de actividad de receptor de manosa (Goerdts et al, 1999). La IL-4 e IL-13 incrementan el metabolismo de la L-arginina y las funciones efectoras de los macrófagos. El metabolismo de la L-arginina contrarresta los efectos de la activación de la sintasa de óxido nítrico 2 (NOS2) y la liberación de óxido nítrico, importante en la fibrosis y en la inflamación granulomatosa. Se ha observado que IL-4 y los glucocorticoides incrementan la expresión del receptor de manosa en macrófagos, incrementando la capacidad de endocitosis y presentación de antígeno (Gordon, 2003).

Los macrófagos activados por la vía alterna ejercen un efecto inmunosupresor hacia las reacciones mediadas por linfocitos Th1, el cual puede ser mediado por IL-10 y/o PGE2 (Nöel et al, 2004). La quimiocina CCL1 asociada a la activación alterna de macrófagos (AMAC-1) se expresa en macrófagos activados por IL-1, IL-13 e IL-10. Los macrófagos activados de manera alterna pueden inducir tolerancia periférica hacia componentes propios o alérgenos del

medio ambiente y también pueden favorecer el desarrollo de tumores (Goerdts et al, 1999).

Los macrófagos M1 y varias formas M2 tienen un repertorio distinto de citocinas y de receptores de citocinas. En general, los macrófagos M1 tienen un fenotipo IL-12<sup>hi</sup>/IL-23<sup>hi</sup>/IL-10<sup>lo</sup>. Son eficientes productores de moléculas efectoras (intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno) y citocinas inflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6), y participan como inductores y efectores en polarizar la respuesta hacia el tipo Th1. Ellos median la respuesta en contra de parásitos intracelulares y tumores. En contraste, varias formas de macrófagos M2 tienen un fenotipo IL-12<sup>lo</sup>/IL-23<sup>lo</sup>/IL-10<sup>hi</sup> y poseen una capacidad variable de producir citocinas inflamatorias, dependiendo de la señal que indujo su activación (Mantovani et al, 2007). De manera general, tienen niveles altos del receptor de manosa y de galactosa, y el metabolismo de arginina cambia a la producción de ornitina y poliamidas. Los macrófagos M2 participan en reacciones polarizadas hacia el tipo Th2, promueven la muerte y encapsulamiento de parásitos, están presentes en el establecimiento y progresión de tumores, en reparación y remodelamiento de tejidos y tienen funciones inmunoregulatoras (Goerdts et al, 1999) (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2 Polarización en la activación de los macrófagos.**

Tipo de activación	Vía clásica (M $\phi$ M1)	Vía Alterna (M $\phi$ M2)
Estímulos	LPS + IFN $\gamma$	IL-4/IL-13, glucocorticoides, TGF- $\beta$
Funciones	Inflamación tipo I Destrucción de tejido Muerte de parásitos intracelulares Resistencia a tumores	Inflamación por respuesta Th2 Remodelación del tejido y angiogénesis Encapsulación de parásitos Favorecen un proceso tumoral
Marcadores moleculares y moléculas efectoras	IL-12 <sup>hi</sup> , IL-23 <sup>hi</sup> , TNF <sup>hi</sup> , IL-1 <sup>hi</sup> , IL-10 <sup>lo</sup> Quimiocinas como CXCL10 Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	IL-12 <sup>lo</sup> , IL-23 <sup>lo</sup> , TNF <sup>lo</sup> , IL-1ra <sup>hi</sup> , IL-10 <sup>hi</sup> Quimiocinas como CCL22 Receptores scavenger, manosa y galactosa <sup>hi</sup>

De manera simplificada se muestran las señales que inducen la activación de los macrófagos por la vía clásica (M1) y por la vía alterna (M2). Las principales funciones efectoras de los macrófagos, marcadores moleculares y moléculas efectoras están resumidas en la tabla (adaptado de Mantovani et al, 2007).

La actividad celular de los macrófagos es modulada por las interacciones que establecen con las células T, fibroblastos y células de la matriz, a través de

un amplio rango de receptores. Las citocinas y los glucocorticoides son potentes moduladores de la activación. Varios patógenos pueden desactivar macrófagos a través de varios mecanismos, M-CSF, PGE<sub>2</sub>, TGF- $\beta$ , TNF (Nöel et al, 2004).

Los monocitos/macrófagos tienen un alto potencial de secreción de moléculas inmunoregulatoras y efectoras. Las citocinas producidas pueden ser de tipo pro-inflamatorio o anti-inflamatorio, dependiendo del tipo de activación que se haya llevado a cabo; y varias de ellas señalizan a través de la cinasa de Janus (JAK) y el transductor de señales y activador de la transcripción (STAT). La tabla 1.3 muestra las citocinas y otras moléculas que son producidas por los monocitos y los macrófagos (Laomureux y Bradley, 2007).

### ***1.3 Receptores de superficie en monocitos/macrófagos***

Para llevar a cabo sus funciones, los monocitos-macrófagos expresan un rango amplio de receptores de membrana. En la respuesta inmune innata juegan un papel importante los receptores tipo Toll (TLR's). Estos son proteínas transmembranales que al ser activadas inducen la activación de NF- $\kappa$ B y la producción de citocinas y de ciertos péptidos con actividad antimicrobiana. Los monocitos expresan los receptores tipo Toll 2, 4, 5, 6 y 9, que están involucrados en la respuesta a distintos productos microbianos (por ejemplo LPS, LTA (ácido lipotético), y lipopéptido de micoplasma). En algunos casos, los TLRs no se unen a estos productos directamente, sino a través de alguna molécula adaptadora que reconoce directamente al ligando (como CD14) (Moynagh et al, 2005).

Los macrófagos expresan receptores para varios fragmentos del complemento (C3b, C3bi, C4b) que se depositan en la superficie de bacterias y protozoarios. Estos receptores pueden mediar la internalización de las partículas. Los macrófagos también pueden llevar a cabo la internalización de partículas opsonizadas con anticuerpos a través de sus receptores Fc $\gamma$ Rs, los cuales una vez que se han agregado pueden transmitir señales activadoras o inhibitoras hacia el interior del macrófago (Viera et al, 2001).

**Tabla 1.3 Citocinas y moléculas efectoras producidas por monocitos/macrófagos.**

Nombre	Fuente	Principales efectos
<b>Mediadores pro-inflamatorios</b>		
IL-1	Macrófagos, monocitos	Activa el endotelio vascular y linfocitos T. Destrucción local de tejido
IL-8	Macrófagos, monocitos	Quimiotáctico y activador de neutrófilos
IL-6 <sup>a</sup>	Macrófagos, monocitos	Activa linfocitos e incrementa la producción de anticuerpos
IL-12	Macrófagos	Activa a células NK, induce diferenciación de células T (Th1)
IL-18	Macrófagos de hígado	Adhesión celular, producción de IFN- $\gamma$
<b>Mediadores anti-inflamatorios</b>		
IL-1ra	Macrófagos, monocitos	Antagonista de IL-1
IL-10	Monocitos	Inhibe liberación de citocinas
TGF- $\beta$	Monocitos	Supresión de la inflamación, saneamiento de tejidos.
<b>Quimiocinas</b>		
IL-8	Monocitos, macrófagos	Potente quimiotáctico y activador de neutrófilos, reclutamiento de Lf T y basófilos
MCP-1 (CCL2)	Monocitos	Quimiotáctico de monocitos, neutrófilos, basófilos y células cebadas; induce la liberación de mediadores citotóxicos de macrófagos
<b>Otros</b>		
Metabolitos de oxígeno (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , OH <sup>-</sup> , HOCl) y NO	Macrófagos	Lisis intracelular, citotoxicidad y daño a vasos.
Complemento	Monocitos, macrófagos	Oponización y fagocitosis de moléculas (C3b), actividad anafiláctica (C3a, C4a, C5a), quimiotaxis y degranulación de eosinófilos y liberación de PGE2 (C3a), quimiotáctico de linfocitos y neutrófilos (C5a).

IL6<sup>a</sup> puede mediar una respuesta pro o anti-inflamatoria, dependiendo de la célula sobre la cual está actuando (Adaptado y recopilado de Laomureux y Bradley, 2007).

La expresión de algunos receptores de membrana de los monocitos-macrófagos varía de acuerdo a su estado de diferenciación, por lo que se les ha usado como marcadores de diferenciación. La mayoría de los monocitos son CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup>, otros marcadores expresados en distintos tipos de macrófagos son: HLA-DR, CD11b (CR3) y CD11c (CR4) (estos dos últimos marcadores son miembros de la familia de integrinas) (Hodgson et al, 2001), CD33 (miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas), CD25, CD69, CD36, CD26 y HLA-DP y -DQ (Imhof et al, 2004; Ziegler et al, 1993). El nivel de expresión de estos marcadores

fenotípicos varía durante el curso de la diferenciación del monocito a macrófago (Tabla 1.4).

**Tabla 1.4 Algunos receptores de macrófagos (MΦ's), sus ligandos y funciones** (Adaptado de Vieira et al, 2001 y 2002).

RECEPTOR	LIGANDOS	FUNCIÓN
CD14	LPS, LTA, peptidoglicano soluble, proteína W1-1 de la superficie de hongos, células apoptóticas.	Reconocimiento y fagocitosis de patógenos y células apoptóticas.
CD36	Colageno tipo I, fosfatidilserina, trombospondina.	Deposito de colesterol en lipoproteínas, limpieza de células apoptóticas.
Receptores del complemento		
CR1	C3b, C4b, C3bi.	Internalización de microorganismos opsonizados.
CR3 (Cd11b/CD18)	C3bi, CD54 (ICAM-1); fibrinógeno, oligodesoxinucleótidos.	Interacción de MΦ-Lf T (CR3), inhibición de la producción de IL-12 (CR3).
CR4	C3bi.	
Receptores Fc $\gamma$	IgG, partículas cubiertas de IgG.	Internalización de microorganismos opsonizados. Inhibición (Fc $\gamma$ RIIB) o activación (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIA) del MΦ.
Receptor de manosa	Oligosacaridos que contienen manosa y fucosa.	Reconocimiento y fagocitosis de patógenos.
NKG2D	Productos del gen RAE-1 y H60.	Activación de MΦ para la producción de TNF y NO.
Proteína reguladora de señal $\alpha$ (SIRP $\alpha$ )	CD47 (proteína asociada a integrinas).	Agregación homotípica y activación de MΦ, interacción de macrófagos con Linfocitos T.
Receptores tipo Toll		
TLR2	Oligosacaridos que contienen manosa, fucosa o galactosa, lipoproteínas.	Unión a productos microbianos, activación de macrófagos.
TLR4	LPS.	
TLR 5	Flagelina.	
TLR 6	Lipopéptido de micoplasma, zymosan.	
TLR 9	Oligonucleotido bacterianos (CpG DNA), dinucleótidos.	Unión a DNA bacteriano, herpesvirus.
Receptor de vitronectina ( $\alpha_v\beta_3$ )	Vitronectina, laminina, fibronectina.	Estimulación de la polimerización de actina.

#### **1.4 Receptores para inmunoglobulina G**

Dentro de los receptores de membrana presentes en los monocitos y macrófagos están los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas (FcR), que son glicoproteínas que tienen un papel fundamental dentro del sistema inmune, acoplado al reconocimiento específico de antígenos por anticuerpos con la inducción de diversas funciones efectoras.

Entre las funciones mediadas por los FcRs están la fagocitosis, endocitosis, generación de especies reactivas de oxígeno e intermediarios de nitrógeno, eliminación de complejos inmunes, activación transcripcional de genes que codifican para citocinas y quimiocinas, etc. La activación de los monocitos y macrófagos también induce cambios en la expresión de proteínas de superficie involucradas en la adhesión celular y en la presentación de antígenos. Los monocitos y macrófagos expresan receptores para inmunoglobulina G (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, y los macrófagos también para el Fc $\gamma$ RIII) y para inmunoglobulina A (Fc $\alpha$ RI) (Van Vugt y Van de Winkel, 2001).

Se han descrito cuatro tipos de receptores para la inmunoglobulina G (Fc $\gamma$ R): Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII y Fc $\gamma$ RIV. De los tres primeros se conocen diversas isoformas. Presentan una porción extracelular altamente conservada, pero su tallo citoplasmático es heterogéneo. El Fc $\gamma$ RI (CD64) es un receptor de alta afinidad, con una porción extracelular con tres dominios de tipo inmunoglobulina, una porción transmembranal y un tallo citoplasmático. Se expresa en membrana asociado a dos cadenas gamma (FcR $\gamma$ ), las cuales contienen un motivo ITAM (motivo de activación basado en tirosina) similar al que se encuentra en los receptores de antígeno de los linfocitos B y T. El Fc $\gamma$ RIIIa (CD32) y el Fc $\gamma$ RIIIa/b (CD16) son receptores de baja afinidad que se unen a complejos inmunes. El Fc $\gamma$ RIIIa tiene dos dominios de tipo inmunoglobulina en su porción extracelular, una porción transmembranal y un tallo citoplasmático, el cual contiene un motivo ITAM. El Fc $\gamma$ RIIIa también tiene dos dominios de tipo inmunoglobulina en su porción

extracelular, una porción transmembranal y un tallo citoplasmático. El Fc $\gamma$ RIIIa está asociado a dos cadenas gamma, a una gamma y una zeta o dos cadenas zeta; cada cadena gamma contiene un motivo ITAM, y cada cadena zeta contiene tres motivos ITAM. El Fc $\gamma$ RIIIb se encuentra anclado a la membrana celular por glicofosfatidilinositol, y se desconoce su mecanismo de activación. El Fc $\gamma$ RIIb es un receptor de tipo inhibitorio que no contiene los motivos ITAM, sino que contiene un motivo ITIM (motivo de inhibición basado en tirosina) (Daëron, 1997). En humanos, el Fc $\gamma$ RIIb se expresa en dos formas alternas: las formas Fc $\gamma$ RIIb1 y b2 (la forma b1 tiene un inserto de 19 aminoácidos en el tallo citoplasmático) (Joshi, 2005). La afinidad con la que cada receptor se une a distintas subclases de IgG es para el Fc $\gamma$ RI 1,3>>4>>>2, para el Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII es 1,3>>>2,4. El Fc $\gamma$ RIV tiene una afinidad por la IgG2a e IgG2b intermedia entre los receptores de baja afinidad Fc $\gamma$ RII, III y el receptor de alta afinidad Fc $\gamma$ RI (Nimmerjahn y Ravetch, 2006) (Tabla 1.5). Los motivos ITAM son secuencias que cumplen el consenso Y-xx-LX<sub>5-12</sub>-YX<sub>2-3</sub>L/I. Los motivos ITIM tienen la secuencia (I/V/L/S)xYxx(L/V) (Ravetch y Bolland, 2001).

### **1.5 Rutas de señalización iniciadas por la agregación de los receptores Fc $\gamma$**

La agregación de los receptores Fc $\gamma$ R en monocitos/macrófagos por complejos inmunes inicia una serie de eventos bioquímicos intracelulares que son necesarios para la inducción de la fagocitosis y otras funciones efectoras. El proceso fagocítico está acompañado de la generación de citocinas pro-inflamatorias, la liberación de enzimas lisosomales, y la activación del complejo de NADPH oxidasa el cual genera especies reactivas de oxígeno que son liberadas dentro del fagosoma.

Las primeras enzimas intracelulares activadas después de la agregación de los receptores Fc $\gamma$ , son miembros de la familia *Src* de cinasas de residuos de tirosina, como Hck, Fyn y Lyn. Estas cinasas se concentran en las denominadas balsas lipídicas (dominios de membrana ricos en colesterol y esfingolipidos); las balsas lipídicas facilitan la localización de los receptores durante su agregación, y

los lípidos de membrana contribuyen a la señalización del Fc $\gamma$ R facilitando el reclutamiento de cinasas a los Fc $\gamma$ R agregados (Kiliszek, 2002). Las cinasas Src activadas fosforilan residuos de tirosinas del ITAM, que sirven como sitios de unión de alta afinidad para Syk, un miembro de la familia de cinasas de residuos de tirosina *Syk/ZAP70* (Cox y Greenberg, 2001). Syk cataliza la fosforilación de diversos sustratos, incluyendo otros ITAMs de los Fc $\gamma$ Rs, PLC $\gamma$ , PI3K, etc. (Fig 1.1).

Si bien todos los receptores Fc $\gamma$ R que contienen ITAMs pueden mediar fagocitosis, estudios realizados en células COS mostraron que el Fc $\gamma$ RIIIa es más eficiente para la fagocitosis de partículas recubiertas de anticuerpos que la cadena  $\gamma$  de los receptores Fc $\gamma$ RI/ $\gamma$  y el Fc $\gamma$ RIIIa/ $\gamma$  (Huang et al, 2004). También se ha demostrado que la sobreexpresión de Syk, una cinasa de residuos de tirosina, en estas células incrementa de manera significativa la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R; el incremento es notablemente más pronunciado por la cadena  $\gamma$  del Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIIIa/ $\gamma$  que cuando es mediada por el Fc $\gamma$ RIIIa (Indik et al, 1995).

Huang y colaboradores sugieren que el Fc $\gamma$ RIIIa se une más rápidamente a Syk que la cadena  $\gamma$  del Fc $\gamma$ R. También sugieren que, aunque la actividad de las cinasas de la familia Src es esencial para la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R, estas cinasas de manera individual (Hck, Fgr y Lyn) interactúan directamente con el Fc $\gamma$ RIIIa afectando no solo la eficiencia de la fagocitosis, sino la capacidad de los receptores para interactuar con Syk. De esta manera sugieren que las diferencias observadas entre la señalización por el Fc $\gamma$ RIIIa y Fc $\gamma$ R/ $\gamma$  pueden estar relacionadas con la habilidad de cada uno de ellos de interactuar con Syk y las cinasas de la familia Src (Huang et al, 2004).

Se ha propuesto que las cinasas de la familia Src están constitutivamente asociadas a Cbl, una proteína ligasa de ubiquitina, la cual está funcionando como una adaptadora al crear estabilidad mecánica dentro del complejo de proteínas (Schmidt y Dickic, 2005).

**Tabla 1.5 Receptores para IgG**

Estructura del receptor	CD	Genes	Isoformas	Afinidad por la IgG (K <sub>a</sub> )	Modulación	Función	
<p style="text-align: center;">γγ</p>	FcγRI	64	1q21.1 (IA, IB, IC)	Ia1	(10 <sup>8-9</sup> M <sup>-1</sup> )	Regulador Negativo: G-CSF, IFNγ, IL-10. Regulador positivo: IL-4, IL-3	Internalización y presentación del antígeno, generación de iones superóxido, ADCC, fagocitosis y producción de citocinas
<p style="text-align: center;">a      b</p>	FcγRII	32	1q23-24 (IIA, IIB, IIC)	Ila, sIIa2, IIb1y IIb2 (sólo en macrófagos), IIc (sólo en células NK)	(10 <sup>7</sup> M <sup>-1</sup> )	Regulador Negativo: IL-4	Ila: Internalización, ADCC, fagocitosis, producción de citocinas y estallido respiratorio. IIb2: Internalización IIb1/IIb2: Regulador negativo de células B, macrófagos y células cebadas.
<p style="text-align: center;">a      b</p> <p style="text-align: center;">γγ, γ5, γ5</p>	FcγRIII	16	1q23-24 (IIIA, IIIB)	IIIa, IIIb (sólo PMN)	(1-3x10 <sup>7</sup> M <sup>-1</sup> )	Regulador Negativo: IL-4 Regulador positivo: TGFβ	IIIa: fagocitosis, ADCC, generación del ión superóxido, producción de citocinas, inducción de la adhesión y apoptosis.
<p style="text-align: center;">γγ</p>	FcγRIV	16- b(en ratón)	1 (en ratón)	?	2-3x10 <sup>7</sup> M <sup>-1</sup>	Regulador Negativo: IL-4, IL-10, TGFβ Regulador positivo: IFN-γ	Internalización y presentación de antígeno.

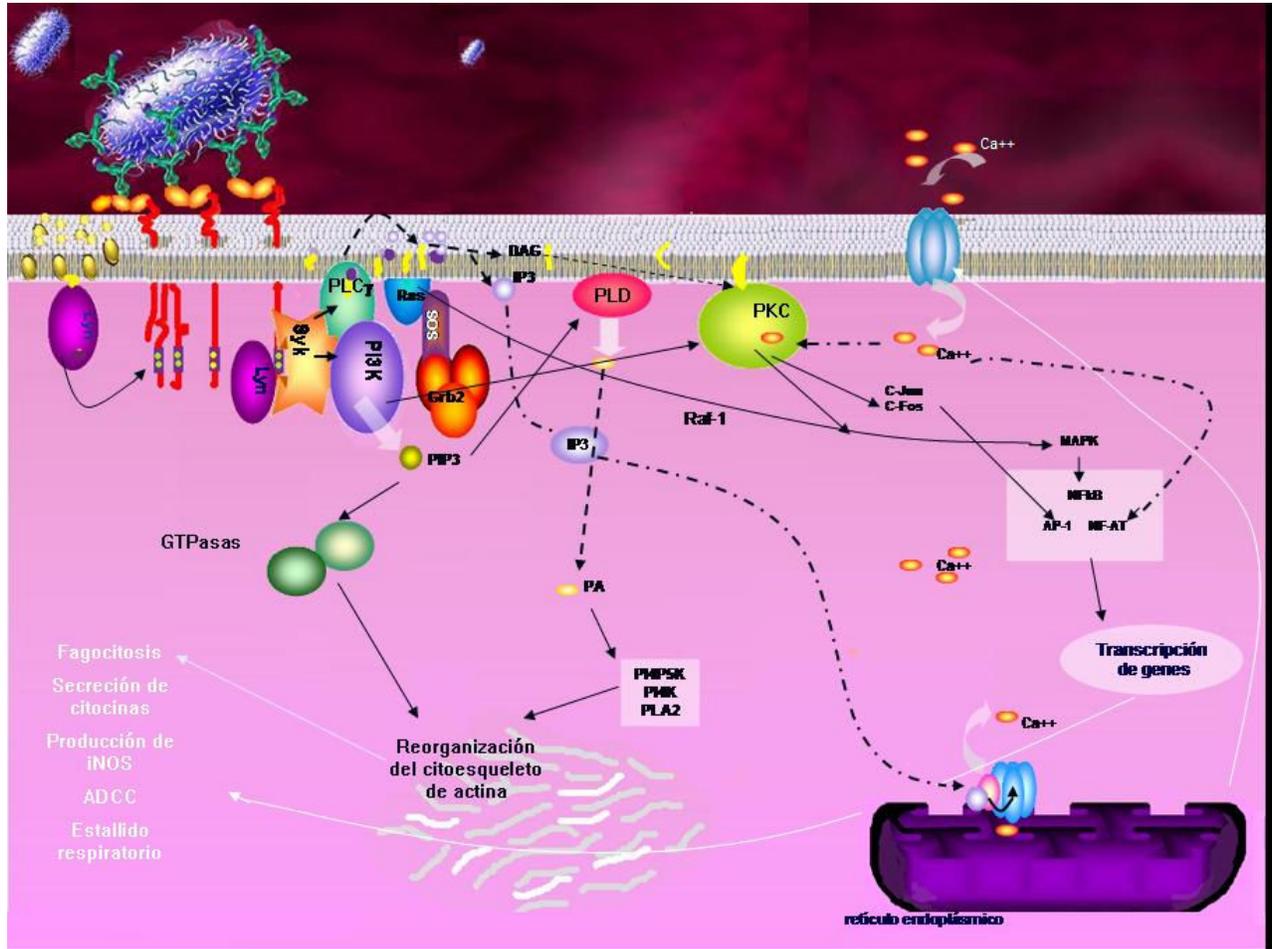
Las tirosinas del ITAM contenidas en el tallo citoplasmático están indicadas en rombos rojos, los ITIM en triángulos verdes. Se representan dos ó tres dominios de unión al ligando en óvalos. Todos tienen un dominio transmembranal y un tallo citoplasmático con excepción del FcγRIIIb el cual está unido a la membrana por glicofosfatidilinositol. También se muestran la función y características de los FcγR's (Adaptado de Däeron, 1997; Ziegler et al, 1993; Hogarth, 2002 y Nimmerjahn et al, 2006).

Se ha demostrado que la agregación de los FcγR's induce la activación de las isoformas clase IA y IB de la fosfatidil-inositol 3-cinasa, (PI3K). Estas enzimas participan en la exocitosis y la emisión de pseudópodos, así como en el remodelamiento de la membrana. La subunidad p110 (la catalítica) de PI3K, genera fosfatidil inositol 3-4-5-trifosfato, PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. El PI(3,4,5)P<sub>3</sub> es crítico para la activación de enzimas que intervienen en el remodelamiento del citoesqueleto requerido para la fagocitosis. Entre estas enzimas tenemos a Btk, de la familia Tec de cinasas de residuos de tirosina involucradas en la movilización intracelular de calcio, el factor intercambiador de nucleótidos de guanina para Rac, Vav (un factor intercambiador de guanina para GTPasas de bajo peso molecular), y Akt (una cinasa de residuos de serina/treonina involucrada en la protección celular contra la apoptosis), etc. (Ganesan et al, 2006). Btk, Rac, Vav y Akt contienen un dominio homólogo de plecstrina (PH), una secuencia de aminoácidos encontrados en numerosas proteínas implicadas en la señalización mediada por receptores (Pengal, 2003). Estas enzimas se mueven del citoplasma a la membrana plasmática o dentro de la membrana plasmática hacia el sitio de agregación del receptor, donde van a cumplir varias de sus funciones.

La polimerización de actina en el sitio de ingestión es regulada durante la fagocitosis mediada por los FcγR por GTPasas de la familia Rac (Rac1 y Cdc42), ARF (ARF6), y de la familia Rho (RhoA), las cuales son reclutadas a los fagosomas. Cdc42 unido a GTP (GTPasa activa) estimula la polimerización de actina a través de su interacción con WASP y la consecuente activación del complejo Arp2/3 (Greenberg y Grinstein, 2002).

También Syk puede fosforilar y activar a la fosfolipasa Cγ1 (PLCγ1), la cual hidroliza el PI(4,5)P<sub>2</sub> a DAG (diacilglicerol) e IP3 (inositol trifosfato). El IP3 conduce a la movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular, a través de su unión a su receptor en el retículo endoplásmico liso. El resultado es un incremento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico. El DAG puede activar a PKC δ/ε (proteína cinasa C isoforma δ/ε) las cuales participan en la formación del fagosoma (Larsen et al, 2000). Una vez activada, PKC puede fosforilar a diversos sustratos como MARKS (proteína miristoilada en alanina). El MARKS citosólico fosforilado permanece asociado a filamentos de actina y calmodulina, pero ya no los entrelaza, dando como

resultado la desestabilización local del citoesqueleto de actina (Swanson y Hoppe, 2004).



**Fig 1.1 Transducción de señales activatorias tras la agregación de los receptores Fc $\gamma$ .** Los receptores Fc $\gamma$ R reconocen complejos inmunes a través de la porción Fc de las IgGs, una vez que se han agregado estos receptores, cinasas de la familia Src como Lyn, Fyn y Hck localizadas en dominios de la membrana ricos en colesterol se activan y fosforilan las tirosinas presentes en los dominios ITAM e ITIM de los receptores Fc $\gamma$ . En la señalización de activación la cinasa de residuos tirosina Syk se une a los residuos de tirosina fosforilados del ITAM a través de su dominio SH2. Syk se activa y va a fosforilar a otras proteínas río abajo de la cascada de señalización, entre ellas se encuentran PLC $\gamma$  y PI3K. El PIP2 es sustrato de PLC $\gamma$ , la cual va a producir DAG e IP3. El IP3 se va a unir a su receptor en retículo endoplásmico liso y va a provocar la liberación de Ca $^{2+}$  en el citosol, el calcio sirve como cofactor de activación de otras proteínas que participan en la señalización que activan a NF-AT para la transcripción de genes. El DAG activa a PKC, la cual va a activar a otras proteínas implicadas en la activación de factores de transcripción, así como a MARKs para desestabilizar el citoesqueleto de actina. PKC también activa a c-Jun y c-Fos (proto-oncogenes) que forman el complejo AP1 (elemento de activación en el DNA) para inducir la transcripción de genes. PI3K produce PI(3,4,5)P $_3$ , que sirve como activador de GTPasas implicadas en la reorganización del citoesqueleto de actina así como a PLD, la cual produce ácido fosfatídico (PA). El PA va a activar a las cinasas de fosfatos de inositol PI4P5K y PI4K, también activa a PLA2 (fosfolipasa A2) implicadas en la reorganización del citoesqueleto de actina. Grb2 (proteína 2 de unión al receptor de factor de crecimiento) está asociado a Sos, se acopla a Ras y activa la vía de MAPK, que activa el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Entre las respuestas que culminan con la señalización se tienen la fagocitosis de complejos inmunes, la secreción de citocinas y la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, el estallido respiratorio y la ADCC.

ARF6 es una GTPasa pequeña que se encuentra en membrana plasmática y modula el ensamblaje de actina. Se sugiere que se requiere para la activación de la PLD (fosfolipasa D). PLD-2 está asociada a la membrana plasmática y cataliza la producción del ácido fosfatídico (PA) requerido para la fagocitosis (Cox y Greenberg, 2001). El PA activa la fosfatidil inositol 4-fosfato 5-cinasa tipo I [PI(4)P5K] para producir fosfatidil inositol 4,5 bifosfato [PI(4,5)P<sub>2</sub>], implicado en la polimerización de actina durante la fagocitosis (Trinchieri et al, 1987).

La fagocitosis de complejos inmunes a través de los Fc $\gamma$ R activa la vía de señalización de Ras/Erk la cual participa en la inducción de la expresión de genes de las citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-6. Se desconoce el mecanismo preciso de señalización (Ganesan et al, 2006).

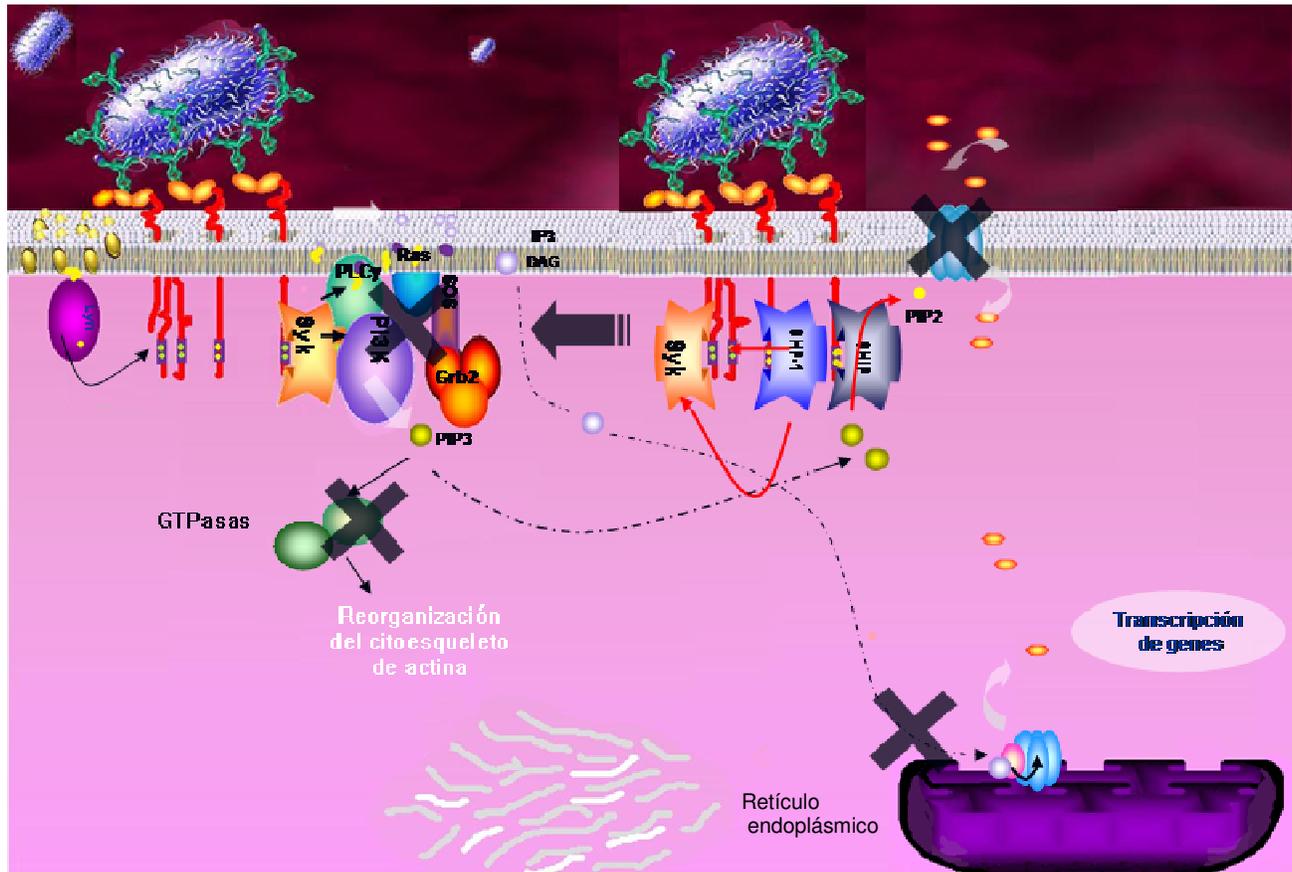
### ***1.5.1 Inhibición de la señalización por ITAMs***

La señal a través de ITAMs está siempre balanceada por señales inhibitorias de receptores que contienen ITIMs. A los ITIMs fosforilados se pueden unir fosfatasas de residuos de tirosina SHP-1, SHP-2 o la fosfatasa de inositol SHIP. Estas fosfatasas desfosforilan proteínas señalizadoras o lípidos, el balance entre ITAMs-ITIMs fosforilados determina el nivel de respuesta de muchos sistemas de receptores.

La regulación negativa de la fagocitosis en los monocitos/macrófagos puede ser mediada por el Fc $\gamma$ RIIb, el cual contiene un ITIM (Cox y Greenberg, 2001). La función inhibitoria del Fc $\gamma$ RIIb es mediada por la fosfatasa de inositol SHIP, la cual se asocia con el ITIM fosforilado a través de su dominio SH2. En la membrana celular la fosfatasa de fosfolípidos de inositol (SHIP) hidroliza PI(3,4,5)P<sub>3</sub> a PI(3,4)P<sub>2</sub>, también puede desfosforilar a PTK y reguladores de MAPK (Joshi, 2005) (Fig 1.2).

En la fagocitosis mediada por Fc $\gamma$ Rs en neutrófilos, los esfingolípidos son metabolizados para producir esfingosina y ceramida libres, las cuales han mostrado inhibir la fagocitosis de partículas recubiertas con IgG. La ceramida

inhibe la actividad de PLD y la esfingosina compite con DAG para unirse a PKC e impedir su activación (Cox y Greenberg, 2002).



**Fig 1.2 Transducción de señales inhibitorias que se dan tras la agregación de los receptores Fc $\gamma$ .** La heteroagregación ITAM-ITIM es necesaria para que el Fc $\gamma$ R11b ejerza su función efectora. En el Fc $\gamma$ R11b las tirosinas del ITIM son fosforiladas por cinasas de la familia Src, y son sitios de unión de las fosfatas de tirosina SHIP, SHP-1 y SHP-2, que van a ejercer su actividad de fosfatas en otras proteínas activadas por la señalización que se da a través de los ITAMs así como de fosfatos de inositol. SHIP hidroliza PIP3 a PIP2 y desfosforila a reguladores de MAPK, de manera que evita la activación de proteínas que requieren a PIP3 para su activación, y la activación de la vía de MAPK. SHP-1 desfosforila a Syk e incluso ITAMs fosforilados, evitando que se activen a otras proteínas río abajo de la señalización.

### 1.5.2 Regulación de la activación mediada por Fc $\gamma$ Rs

La homoagregación del Fc $\gamma$ 11b no conduce a ninguna función efectora, sin embargo, cuando hay heteroagregación (ITAM-ITIM), se inhibe la activación de los Fc $\gamma$ Rs a través del ITAM. La función inhibitoria del Fc $\gamma$ R11b, es regular negativamente la actividad celular por ajuste de la señal activatoria en el que los

complejos inmunes activan a las células. El balance entre la señalización por los receptores activadores e inhibidores determina la magnitud de la respuesta celular (Wijngaarden, 2004).

La expresión del Fc $\gamma$ R11b en la superficie de los monocitos humanos está altamente regulada por citocinas anti-inflamatorias como la IL-4, IL-10, etc. (Tridandapani et al, 2002). En pacientes con artritis reumatoide se observan altos niveles de expresión de los receptores activadores Fc $\gamma$ R1 y Fc $\gamma$ R11a. El IFN- $\gamma$  regula positivamente la expresión del Fc $\gamma$ R1. El TNF $\alpha$  regula negativamente la expresión del Fc $\gamma$ R11b y la activación de los Fc $\gamma$ R. La IL-10 regula positivamente la expresión del Fc $\gamma$ R11b y todos los receptores activadores. La IL-4 con IL-10 alteran el balance en favor del Fc $\gamma$ R11b y previenen la producción de TNF $\alpha$  cuando son agregados con IgG (Wijngaarden et al, 2004).

Todas estas observaciones indican que la activación de los receptores Fc $\gamma$  está finamente regulada a través de diversos mecanismos, los cuales pueden estar intercomunicados para que, finalmente, se tenga una respuesta inmune apropiada ante un antígeno sin llegar a tener una respuesta inflamatoria exacerbada o una respuesta autoinmune.

### ***1.6 Cinasa de residuos de tirosina Syk***

Syk (cinasa de residuos de tirosina de bazo) es una enzima citosólica con actividad de cinasa de residuos de tirosina (PTKs). Las PTKs son moléculas que participan en el control de muchos procesos celulares. Una PTK no funcional resulta en una variedad de enfermedades como cáncer, diabetes, inmunodeficiencias y muchas otras (Schlessinger, 2003).

Syk se expresa en todas las células hematopoyéticas y es esencial para el desarrollo de los linfocitos y la transducción de señales vía distintos receptores en células linfoides y no linfoides (Turner et al, 2000).

Tiene un peso molecular de 72 kDa, contiene un dominio de cinasa en el extremo C-terminal, y dos dominios SH2 que se unen a ITAMs fosforilados; también contiene una región designada como interdominio B, que se encuentra entre los dominios SH2 y el dominio de cinasa, el cual contiene múltiples tirosinas.

Estas tirosinas cuando son fosforiladas actúan como un sitio de unión para proteínas como la fosfolipasa C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1), Vav y Cbl, la cuales son sustratos de Syk y ZAP70. La forma más abundante de Syk contiene un inserto de 23 aminoácidos en el interdominio B. La forma menos abundante, SykB, no contiene este inserto (Tabla 1.6). Se ha mostrado que la consecuencia de esta diferencia es que Syk se une más eficientemente al ITAM fosforilado que SykB y por ende es más eficiente en la señalización intracelular (Turner et al, 2000).

Syk se activa como consecuencia de la agregación Fc $\gamma$ Rs y se asocia con los ITAMs fosforilados de los receptores Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa y Fc $\gamma$ RIIIa. Se ha demostrado que la actividad catalítica de Syk puede ser activada in vitro por la unión de péptidos sintéticos que contienen el ITAM fosforilado. Syk es fosforilada en las posiciones Y342 y Y346, y los dominios SH2 contenidos en múltiples proteínas como la PLC- $\gamma$ , Vav se unen a este sitio doblemente fosforilado (Groesch et al, 2006). En células B, cuando Syk es fosforilada (en la tirosina 317) por Lyn, se crea un sitio de unión para Cbl-c, un potencial regulador negativo en la señalización dependiente de Syk; este también es sitio de unión del dominio SH2 presente en la subunidad p85 de PI3K (Moon et al, 2005).

### ***1.7 Fosfatasa de residuos de tirosina SHP-1***

SHP-1 (fosfatasa 1 de residuos tirosina con dominios SH2), es una enzima citoplasmática, de 68 kDa involucrada en múltiples sistemas de señalización. En ratones motheaten (que carecen de esta proteína) se observan diversas disfunciones hematopoyéticas como inflamación crónica, autoinmunidad sistémica y muerte por pneumonitis hemorrágica (Poole y Jones, 2005). Se expresa en macrófagos, megacariocitos, timocitos, células B y T y líneas celulares eritroides (Thomas, 1995). Juega un papel muy importante en la regulación de la proliferación en macrófagos. Hay 4 isoformas de SHP-1 que varían en la secuencia de tres aminoácidos de la región N-terminal. Se ha identificado otra forma de SHP-1, la SHP1-L, la cual es más grande y difiere por 66 aminoácidos en la región C-terminal (no tiene la serina<sup>591</sup>) y esto la hace más activa para

desfosforilar a ZAP-70 en linfocitos T, se localiza en el citoplasma (Poole y Jones, 2005).

SHP-1 contiene dos dominios SH2 posicionados en la región N-terminal. El dominio SH2<sub>1</sub> del extremo N-terminal funciona como regulador negativo de la activación celular, y el dominio SH2<sub>2</sub> que le sigue funciona predominantemente para el reclutamiento de otras proteínas. SHP-1 tiene un motivo catalítico, caracterizado por la secuencia V/I-H-C-S-X-G, que es estrictamente específico de fosfotirosina. También contiene un tallo en la región C-terminal, el cual contiene sitios de fosforilación de tirosinas y serinas, y se ha propuesto que esta región tiene una importante función regulatoria (Tabla 1.6).

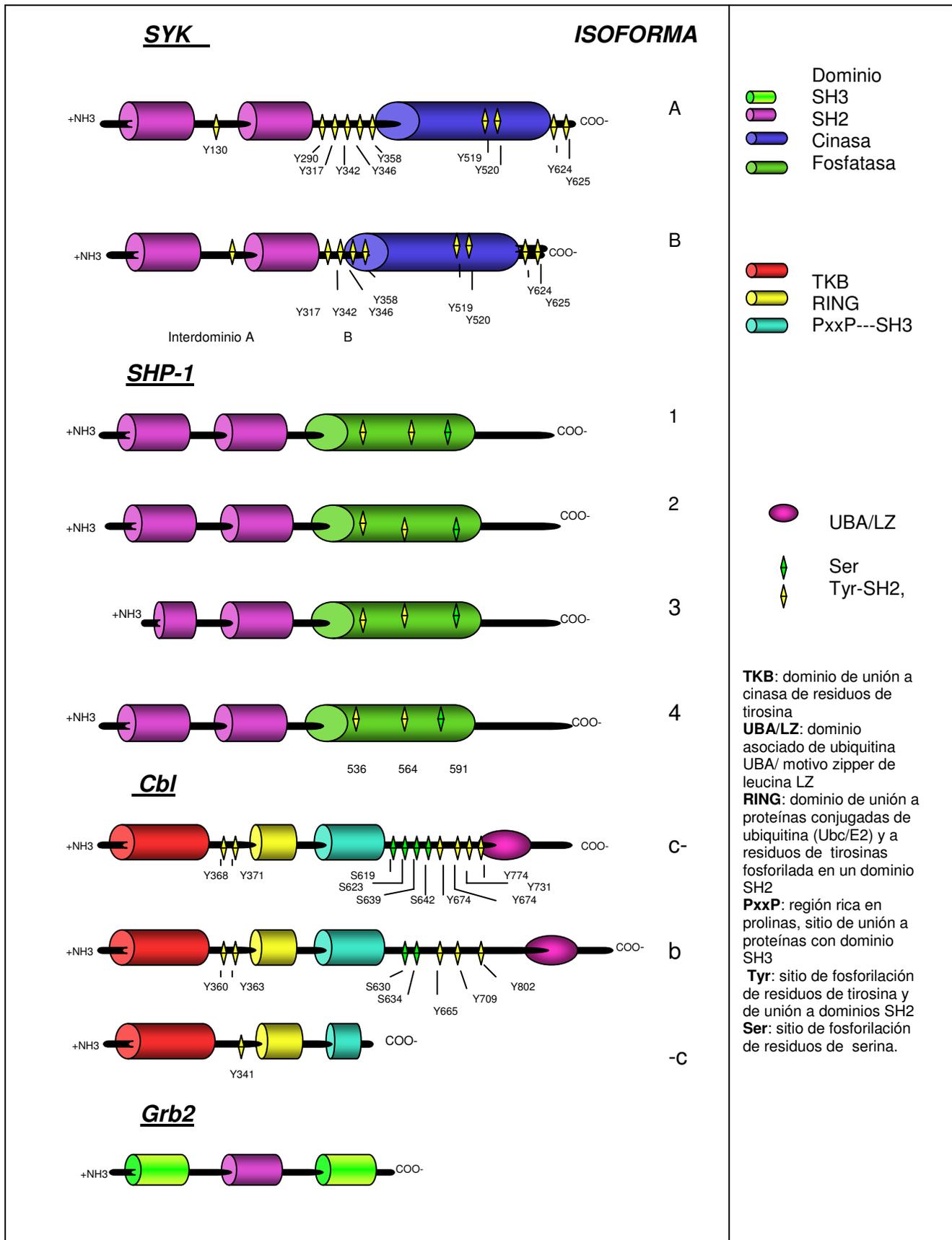
En el estado inactivo, el dominio SH2<sub>1</sub> de la región N-terminal interactúa con el sitio catalítico, y parte de la región del dominio SH2<sub>1</sub> (NXGDY/F) se inserta dentro del sitio mismo. En cuanto se une un fosfopéptido en el dominio SH2<sub>1</sub>, hay un cambio alostérico, y la enzima se vuelve activa. Parte de la región del dominio SH2<sub>2</sub> interactúa con el dominio SH2<sub>1</sub>. De esta manera, el dominio SH2<sub>1</sub> es un regulador crítico en la actividad de fosfatasa.

Muchos estudios han mostrado que SHP-1, SHP-2 y SHIP reconocen distintos motivos pY de varios receptores vía el dominio SH2, y hay otros reportes que mencionan que estas enzimas pueden competir por el sitio de unión, sugiriendo que hay cierto solapamiento en las secuencias que reconocen. A través de sus dominios SH2, pueden regular un amplio rango de proteínas señalizadoras (Sweeney, 2005).

En cuanto al papel que juega el tallo de la región C-terminal de SHP-1, se proponen los siguientes mecanismos:

a) Esta región contiene residuos de tirosina que pueden ser fosforilados; las consecuencias funcionales de esta modificación han sido controversiales. Por una parte se propone que esta fosforilación puede ayudar a SHP-1 para funcionar como adaptadora, al reclutar a proteínas como Grb2 y SHIP, a través de sus dominios SH2. También se ha propuesto que la fosforilación es para regular su actividad de fosfatasa.

**Tabla 1.6 Proteínas que participan en la señalización de los receptores Fcγ: Syk, SHP-1, Cbl y Grb2 (Adaptado de Poole y Jones, 2005; Schmidt y Dickic, 2005; Turner et al, 2000)**



La actividad enzimática de SHP-1 está incrementada cuando las tirosinas 536 y 564 del tallo en la región C-terminal están fosforiladas (Zhang 2002). Se ha observado que la fosforilación de una serina (situada en la región C-terminal) puede inhibir la actividad catalítica de SHP-1, aunque no se conoce la identidad de la molécula que lleve a cabo esta fosforilación (Minno et al, 2004).

b) El tallo C-terminal puede interactuar con lípidos de membrana. Se ha mostrado que una fracción de SHP-1 se permanece constitutivamente asociada a las balsas lipídicas en linfocitos T. Adicionalmente se ha mostrado que el extremo C-terminal se une al ácido fosfatídico (PA), y en menor grado al fosfatidil-inositol 3,4,5 trifosfato, 4,5 difosfato y fosfatidilserina. Estos fosfolípidos pueden activar a SHP-1, mostrando otro mecanismo de actividad regulatoria y/o localización celular de SHP-1 (Poole y Jones, 2005).

Kant y colaboradores (2002) mostraron que la sobreexpresión de SHP-1 conduce a la eliminación de la fagocitosis de eritrocitos sensibilizados en macrófagos de la línea J774, indicando que SHP-1 regula negativamente la fagocitosis mediada por los  $Fc\gamma R$ s. Estos autores sugieren que la señal de activación mediada por Syk, cinasas de la familia Src (como Lyn, Fyn, Hck), la adaptadora Cbl, la cinasa PI3K y la GPasa Rac son señales activadoras opuestas a las de SHP-1. También mostraron que SHP-1 se asocia con Cbl, y que esta asociación lleva a la pérdida de la fosforilación de Cbl y la supresión de Rac. También se encontró a Cbl asociada con Grb2, sugiriendo que a través de su dominio SH2, Grb2 se une a SHP-1. En ratones *motheaten* en SHP-1, la señalización del  $Fc\gamma RIII$  es deficiente, sugiriendo un papel de SHP-1 en el control de la señalización mediada a través del ITIM (Kant, 2002), los macrófagos hiperproliferan en respuesta al factor estimulador de colonias tipo I (CSF-1) (Zhang et al, 2000) y se encuentra alterada la expresión de citocinas (Zhao y Curie, 2004).

La fagocitosis iniciada por el  $Fc\gamma RIIIa$  es regulada negativamente por la actividad de la SHIP-1 (fosfatasa de fosfatos de inositol) y SHP-1. Ganesan y colaboradores (2003) demostraron que SHP-1 se asocia con la tirosina fosforilada de la región N-terminal del ITAM del  $Fc\gamma RIIIa$ , y que Syk se asocia con la tirosina situada en la región C-terminal del ITAM. La asociación de SHP-1 con el ITAM del  $Fc\gamma RIIIa$  suprime la fosforilación de la tirosina, sugiriendo que proteínas que

señalizan como Syk, o la subunidad p85 de PI3K, pueden ser sustrato de SHP-1. De esta manera SHP-1 puede regular negativamente la señalización posterior. También se mostró que SHP-1 no se requiere para la función del Fc $\gamma$ R11b (Ganesan et al, 2003).

SHP-1 y SHIP pueden inhibir la fagocitosis mediada por el Fc $\gamma$ R11a y la transducción de señales en ausencia del Fc $\gamma$ R11b, sugiriendo que las fosfatasas que contienen un dominio SH2, como SHIP y SHP-1, pueden modular la señalización por unión a los receptores activadores (Huang et al, 2003). Se propone que SHP-1 puede actuar como un efector específico del Fc $\gamma$ R11, el cual claramente inhibe la activación de los macrófagos (Coggeshal et al, 2002).

### ***1.8 La proteína adaptadora Grb2***

Grb2 (proteína 2 de unión al receptor de factor de crecimiento), es una molécula adaptadora con un peso molecular de 23 kDa, no tiene una actividad enzimática intrínseca; se une a secuencias pYxNx que se encuentran en proteínas como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidermal) (Machida et al, 2005).

Grb2 usa su dominio SH2 para unirse a una tirosina fosforilada de una proteína, y sus dos dominios SH3 los usa para unir regiones ricas en prolina de proteínas efectoras río abajo. Esta adaptadora ensambla y regula las actividades de señalización de complejos de proteínas en respuesta a la actividad de cinasas de residuos de tirosina (Tabla 1.6), como en la señalización de Ras/MAPK (Feng, 1993) y en PI3K/Akt en respuesta a la estimulación de un RTK en la membrana celular (Schlessinger, 2003).

El dominio SH2 de Grb2 se une a SHP-1 y posiblemente recluta proteínas que contienen una tirosina fosforilada para ser desfosforiladas por SHP-1 (Kant, 2002). Se ha reportado que el dominio SH3 de Grb2 se asocia con c-Cbl (isoforma de Cbl).

## **1.9 La proteína adaptadora Cbl**

Cbl (Casitas B-lineage lymphoma) es una proteína de 120 kDa que es fosforilada en residuos de tirosina en respuesta a la activación de receptores de factores de crecimiento, receptores de citocinas e integrinas. Tiene dos actividades distintas, pero interrelacionadas: la primera es funcionar como una proteína adaptadora que conecta a proteínas de señalización dentro de un complejo de multiproteínas y la segunda función es la actividad de ligasa de ubiquitina E3, donde sus blancos son receptores con actividad de cinasas de residuos de tirosina. Como ejemplo están los receptores del factor de crecimiento epidermal (EFG), del factor de estimulación de colonias macrófagos (M-CSF) y otras moléculas señalizadoras, incluyendo las cinasas de la familia Src. La ubiquitinilación de estas proteínas por Cbl las marca para su subsecuente degradación proteolítica. Estas actividades de Cbl le dan la capacidad de regular las actividades de numerosos receptores (Schlessinger, 2003).

Cbl es un regulador negativo de receptores de cinasa de tirosina (RTKs). Se ha sugerido que tiene múltiples papeles dentro de la señalización, posiblemente su función adaptadora o de anclaje potencia la señalización de los RTKs (Mesesson et al, 2003).

En mamíferos hay tres isoformas de Cbl: c-Cbl y Cbl-b tienen alta identidad de secuencia, particularmente dentro de la región N-terminal (84% identidad). Ambas proteínas tienen un dominio de unión a cinasa de tirosina (TKB) en la región N-terminal; este dominio se une a tirosinas fosforiladas de RTKs activados y otras moléculas de señalización. c-Cbl tiene un dominio RING que se une a enzimas conjugadas de ubiquitina (Ubc, E2) y a residuos de tirosina fosforilados que contienen un dominio SH2 (sin tener la actividad de ligasa de ubiquitina). c-Cbl también se une a diversos motivos ricos en prolina, a cinasas de la familia Src y a otras proteínas (como Grb2) a través de su dominio SH3. Contiene un dominio asociado a ubiquitina (UBA) que sobrelapa con un motivo de zipper de leucina (LZ) en la región C-terminal. El motivo zipper de leucina media la dimerización de c-Cbl. El dominio UBA de c-Cbl y Cbl-b parece diferir en la capacidad de unir proteínas ubiquitiniladas. La tercera isoforma, Cbl-c, tiene los dominios

mencionados anteriormente, con excepción de la región zipper de leucina (Schmidt y Dikic, 2005) (Tabla 1.6). Cbl es regulado por fosforilación. Cuando se fosforila en un residuo de tirosina, se generan sitios de unión para proteínas que tienen un dominio SH2, como la subunidad p85 de PI3K, Crk, proteínas adaptadoras, el factor intercambiador de nucleótidos de guanina Vav, y posiblemente Src y otras cinasas de la familia Src, así como Syk/Zap70 (Rao et al, 2002).

Cbl-b puede interactuar con GTPasas que participan en el rearrreglo del citoesqueleto: se ha mostrado que Cbl facilita la estimulación de Rac1 o Cdc42 (a través de la subunidad reguladora p85 de PI3K) y R-Ras (Schmidt y Dikic, 2005). Se sugiere que en osteoclastos al menos dos actividades de Cbl pueden potencialmente contribuir en la regulación: el reclutamiento de PI3K (uniéndose a través de la subunidad reguladora p85) al complejo de adhesión, así como el reclutamiento y regulación de la actividad de dinamina, las cuales han sido relacionadas con la regulación de actina de otros sistemas celulares (Horne et al, 2005). Se ha reportado que Cbl-c funciona como una adaptadora para PI3K en células THP-1 diferenciadas a neutrófilos y estimuladas a través del Fc $\gamma$ RII (Momose, 2003).

c-Cbl participa en la regulación negativa de los linfocitos, a través de su asociación con una gran variedad de moléculas de señalización como Grb2, Crk, PI3K, Vav, Syk y Zap70. La señal de ubiquitinación producida por Cbl representa un mecanismo de regular negativamente la señalización alterando la cantidad de componentes transduccionales disponibles (Leo et al, 2001).

Cbl-c parece ser un regulador negativo potencial en la señalización dependiente de Syk. En las plaquetas, la mayoría de Syk activada es ubiquitinada, sugiriendo que la poliubiquitinación juega un importante papel regulatorio. Experimentos en ratones deficientes de Cbl-c son consistentes con la hipótesis de que la interacción de Cbl-c con Syk regula la desfosforilación de Syk (Moon, 2005).

## Capítulo 2

### **ANTECEDENTES**

Los Fc $\gamma$ R's son una familia de receptores con un número relativamente alto de isoformas, pero que parecen mediar las mismas funciones. Lo que no está claro es si las vías de señalización inducidas a través de cada isoforma de receptor son siempre las mismas, o si esto depende de factores presentes en el medio extracelular (como diferentes citocinas), o del fenotipo (estado de diferenciación de la célula), considerando que hay una gran heterogeneidad de monocitos/macrófagos en diferentes etapas de diferenciación y activación.

En nuestro laboratorio se busca explicar esto comparando la señalización a través de los Fc $\gamma$ Rs en células en distintos estados de diferenciación/activación. Para esto se estableció un modelo de diferenciación *in vitro*, usando el metabolito activo de la vitamina D3, la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-vitamina D3 (VD3) y células de la línea THP-1, las cuales se encuentran en una etapa promonocítica, con un potencial de maduración hacia las etapas monocítica y de macrófago. Las células de la línea THP-1, después del tratamiento con diferentes inductores de diferenciación se diferencian a macrófagos, de manera semejante a como lo hacen los monocitos humanos de sangre periférica, MHSP. Comparándolas con otras líneas celulares de origen mieloide, como las HL-60, U-937, KG-1 o Hell, las células de la línea THP-1 diferenciadas tienen una mayor semejanza a los macrófagos obtenidos a partir MHSP, es por eso que el cambio fenotípico inducido por VD3 representa un buen modelo para estudiar los mecanismos involucrados en la diferenciación de macrófagos (Auwerx, 1991).

Trabajos previos en el laboratorio demostraron que en células THP-1 no diferenciadas la agregación de los Fc $\gamma$ RII induce la fosforilación y activación significativa de Syk, mientras que en células THP-1 diferenciadas *in vitro* con vitamina D3, la agregación de los receptores Fc $\gamma$ RII induce una disminución del nivel de fosforilación y de actividad de Syk. La diferenciación *in vitro* no induce cambios en la expresión de las isoformas del Fc $\gamma$ RII (IIa<sub>1</sub>, IIa<sub>2</sub>, IIb<sub>1</sub>, IIb<sub>2</sub>, IIc<sub>1</sub>,

detectados por RT-PCR). Estos resultados sugirieron que los efectos observados en la activación de Syk a través del Fc $\gamma$ RII podían ser mediados por cambios inducidos por la diferenciación en la expresión y activación basal de Syk, así como cambios en la asociación de Syk con la fosfatasa de tirosina SHP-1; sugiriendo que la señalización bioquímica inducida por el Fc $\gamma$ RII podía ser dependiente del estado de diferenciación de la célula (Agramonte et al, 2003).

La vitamina D3 está involucrada en el control del crecimiento y diferenciación de diversos tipos celulares. Su acción está mediada por su unión a un receptor nuclear, el cual es miembro de la superfamilia de receptores hormonales (Rogler et al, 1998). En el presente trabajo se utilizó la VD3 como agente inductor de diferenciación celular.

### ***2.1 La vitamina D3 como inductor de diferenciación de células monocíticas***

Existen diversos tipos de inductores de diferenciación de células monocíticas. Bajo la acción de estos agentes, pueden producirse poblaciones celulares diferentes entre sí. Entre los agentes que se han reportado como capaces de inducir diferenciación para este linaje celular se encuentran los ésteres de forbol (como el PMA, miristato de forbol acetato), el INF- $\gamma$ , VD3 (Tokuda y Levy, 1996), ácido retinoico y dimetilsulfóxido (Trinchieri et al, 1987; Martínez, 2002).

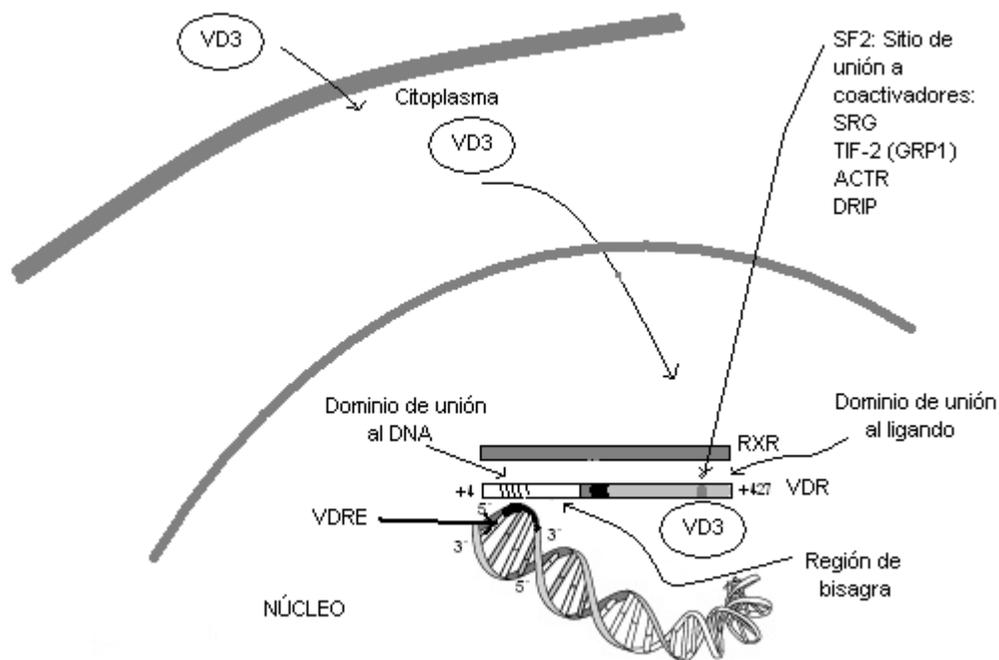
La vitamina D3 es una hormona esteroide que se encuentra inactiva en el organismo y requiere ser activada para ser funcional. Esta vitamina se forma por la irradiación solar de luz UV a partir de su precursor, el 7-deshidrocolesterol presente en la piel mediante la regulación de la hormona paratiroidea (PTH). La forma activa de la vitamina D3, la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-vitamina D3 (VD3), es un importante regulador del metabolismo mineral y de la homeostasis del calcio (Monkawa, 2000), y está involucrada en el control del crecimiento y diferenciación de diversos tipos celulares, entre ellos líneas hematopoyéticas humanas.

La VD3 modula varias funciones de los monocitos/macrófagos, como la quimiotaxis, la producción de peróxido de hidrógeno, la expresión de marcadores

de diferenciación (Gurlek, et all, 2002), y la expresión de moléculas MHC de clase II (Tokuda y Levy, 1996).

El tratamiento con VD3 de células THP-1 por 72 horas induce diversos cambios como un incremento en la expresión de CD14 (receptor de LPS) y CD11b/CD18 (CR3) y un aumento en la adherencia a las superficies de plástico (Martínez, 2002).

La VD3 activa algunas proteínas con actividad de cinasa, como PKC, Raf y MAP cinasas. La activación del monocito/macrófago es acompañada por la adquisición de la actividad 1 $\alpha$ -hidroxilasa, capaz de convertir la 25-hidroxivitamina D3 en 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D3, la forma activa (Monkawa et al, 2000).



**Fig 2.1 Mecanismo de acción de la VD3.** La VD3 se une al VDR (receptor de vitamina D3), el cual heterodimeriza con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR), en el núcleo el complejo resultante se une a elementos de respuesta para la VD3 (VDRE), secuencias de DNA hacia el extremo 5' para inducir la transcripción. Al sitio SF2 del VDR se unen coactivadores o corepresores y junto con una maquinaria basal de transcripción se activan o reprimen genes específicos.

La forma activa de la VD3 se une al receptor nuclear de vitamina D (VDR) con alta afinidad ( $K_d$  entre  $10^{-10}$  y  $10^{-11}$ M). Este receptor tiene un peso molecular de 52-56 kDa. Es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares para hormonas, que incluyen los receptores de estrógenos, progesterona, glucocorticoides, tiroxina, aldosterona y ácido retinoico. El receptor tiene un dominio de unión a ligando con una región hidrofóbica en la porción –COOH terminal y un dominio de unión a DNA en la región reguladora de sus genes blanco, el cual modula la transcripción de los genes por la RNA polimerasa II. La unión del receptor con el ligando induce cambios conformacionales en el receptor que propician su heterodimerización con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR), y la formación del complejo VDR/RXR/co-factor (Shaffer y Gertwirth, 2004). El complejo resultante entra al núcleo y se une a una secuencia de DNA llamada VDRE (elemento de respuesta para la VD3), actuando como un factor transcripcional induciendo la activación o represión de la expresión de genes. Se ha reportado que el VDR inhibe la expresión de genes para la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular y a una familia de genes de factores de transcripción (EF2). También modula la transcripción de genes actuando sobre los factores de transcripción NFAT, NF $\kappa$ B y la familia de factores SMAD (Boonstra et al, 2001), e inhibe la producción de citocinas inflamatorias como IL-12 y TNF por macrófagos (Hewinson et al, 2003) (Fig 2.1).

## ***2.2 Planteamiento del problema***

Los receptores para la porción Fc de la inmunoglobulina G (Fc $\gamma$ R) presentes en las células leucocitarias, median un gran número de respuestas celulares que son importantes en la defensa del hospedero. En humanos, existen diferentes tipos de Fc $\gamma$ R activadores: el Fc $\gamma$ RI, el Fc $\gamma$ RIIa y el Fc $\gamma$ RIIIa, que transmiten señales a través de una secuencia de aminoácidos denominada ITAM (motivo de activación basada en tirosina). El Fc $\gamma$ RIIb, en cambio, contiene un ITIM (motivo de inhibición basado en tirosina), que actúa como regulador negativo de la señalización inducida por los Fc $\gamma$ Rs activadores.

Las señales activadoras a través del ITAM son moduladas por señales inhibitorias mediadas por los receptores que contienen motivos ITIM en su tallo citoplasmático, determinando el nivel de respuesta de muchos sistemas de receptores en células que participan en la respuesta inmune. Es de interés particular que una célula que contenga receptores activadores o inhibidores que unen el mismo ligando, como el Fc $\gamma$ RIII (CD16, ITAM) y el Fc $\gamma$ RIIB (CD32, ITIM) en células mieloides.

En la señalización mediada por los Fc $\gamma$ R's, la activación de Syk es un paso crucial. Trabajos previos han demostrado que en células de la línea monocítica humana THP-1, la agregación de los receptores Fc $\gamma$ RII induce la fosforilación y activación de Syk, pero en las células THP-1 diferenciadas con 1 $\alpha$ ,25 dihidroxivitamina D3 la agregación de estos receptores induce una disminución significativa de la fosforilación de Syk. También se ha visto que una proteína con actividad de fosfatasa de residuos de tirosina, SHP-1, se encuentra asociada a Syk, sugiriendo que el nivel de asociación de SHP-1 con Syk está relacionado a la diferenciación y que el nivel de fosforilación de Syk es regulado por SHP-1 (Agramonte et al, 2003). Estos cambios aún no han sido determinados en monocitos humanos de sangre periférica (MHSP).

El objetivo de este proyecto es estudiar la interacción de Syk con la fosfatasa SHP-1 en células monocíticas humanas durante su diferenciación con VD3 (MHSP), así como la participación de proteínas adaptadoras y como en su dependencia de la señalización a través de receptores para Fc $\gamma$ , tanto en células THP-1 como en MHSP.

## Capítulo 3

### ***HIPÓTESIS***

La diferenciación con VD3 de monocitos humanos afecta la señalización a través de los Fc $\gamma$ R's, debido a que se modifica la asociación de Syk con SHP-1 y/o con las proteínas adaptadoras Cbl y Grb2.

### ***OBJETIVO GENERAL***

Determinar si la diferenciación de células monocíticas humanas inducida con VD3 modifica la interacción de Syk con la fosfatasa SHP-1, antes y durante la señalización a través de los Fc $\gamma$ R, así como la participación de Cbl y Grb2 en esta interacción.

### ***3.1 OBJETIVOS PARTICULARES***

- Determinar cambios en la asociación de Syk y SHP-1 inducido por la agregación de los receptores Fc $\gamma$ RI o Fc $\gamma$ RII en MHSP antes y después de su diferenciación con VD3.
- Determinar si hay relación entre el nivel de fosforilación de Syk y su asociación con SHP-1 cuando los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII son agregados en monocitos humanos (incuye células THP-1 y MHSP) con y sin tratamiento con VD3.
- Determinar la posible asociación de Cbl y Grb2 con Syk y SHP-1 cuando los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII son agregados en monocitos humanos con y sin tratamiento con VD3.

## **3.2 METAS**

### **Objetivos 1 y 2:**

1. Determinar cambios en la asociación de Syk y SHP-1 por la agregación de los receptores Fc $\gamma$ RI o Fc $\gamma$ RII en MHSP antes y después de su diferenciación con vitamina D3.
2. Determinar si hay una relación entre el nivel de fosforilación de Syk y su asociación con SHP-1 cuando los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII son agregados en monocitos humanos con y sin tratamiento con vitamina D3.

Meta 1-2.A Evaluar por inmunoprecipitación la asociación de SHP-1 y Syk en células tratadas y no tratadas con VD3.

Meta 1-2.B Determinar si la asociación de SHP-1 con Syk se modifica como consecuencia de la agregación de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII.

Meta 1-2.C Determinar el nivel de fosforilación de Syk en células tratadas y no tratadas con VD3, antes y después de la agregación de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII.

### **Objetivo 3**

3. Determinar la posible asociación de Cbl y Grb2 con Syk y SHP-1 cuando los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII son agregados en monocitos humanos con y sin tratamiento con vitamina D3.

Meta 3.A Estandarizar la detección de Cbl y Grb2 en inmunoblots de lisados totales de monocitos humanos.

Meta 3.B Determinar la presencia de Cbl y Grb2 en inmunoblots de inmunoprecipitados de Syk obtenidos en monocitos humanos con y sin estímulo a través de Fc $\gamma$ Rs.

## Capítulo 4

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.1 Anticuerpos y reactivos**

El Suero fetal de bovino (SFB) se obtuvo de Gibco Laboratories (Grand Island, NY). La  $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2$  VitD<sub>3</sub>, VD<sub>3</sub> fué de CALBIOCHEM (La Jolla, CA). La albúmina sérica bovina (BSA) de Sigma (St. Louis, MO). Los anticuerpos monoclonales murinos anti-humano Fc $\gamma$ RI (32.2) y Fc $\gamma$ RII (IV.3) se purificaron en nuestro laboratorio de sobrenadantes de los cultivos de hibridomas obtenidos del ATCC. Los anticuerpos monoclonales anti-DNP 2C5 (IgG1) y 4F8 (IgG2b), usados como control de isotipo en los ensayos de citometria también se produjeron en nuestro laboratorio de sobrenadantes de los cultivos obtenidos de hibridomas. Los fragmentos F(ab) $'_2$  de los anticuerpos anti-Fc $\gamma$ RI y anti Fc $\gamma$ RII se prepararon a partir de los anticuerpos con pepsina inmovilizada (Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos anti-Syk (SC-573), anti-SHP-1 (SC-287), anti-fosfotirosina (PY-20-HRP, SC-508HRP), anti-Cbl (SC-170) y anti-Grb2 (SC-255) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Los fragmentos F(ab) $'_2$  anti-IgG de conejo producidos en cabra y el anticuerpo IgG-HRP anti-ratón, de Jackson Immuno Research (Amish, PA). Los anticuerpos anti CD-14-FITC (PNIMO6450) y anti CR3-PE (CD11b) (PNIM2581) fueron de Beckman Coulter. El anticuerpo anti IgG murino-FITC fué de Zymed. Para el aislamiento de los monocitos humanos de sangre periférica se usó Lymphoprep (Axis-Shield, Oslo, Norway).

#### **4.2 Obtención de monocitos humanos aislados a partir de sangre periférica.**

A partir de concentrados leucocitarios provenientes de donadores sanos del Banco de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI, se realizó un gradiente de densidad con una solución de Lymphoprep para obtener la fracción correspondiente a las células mononucleares (que correspondieron a los linfocitos

y monocitos). Los monocitos se purificaron de esta fracción por adherencia a superficies de plástico

Se determinó la viabilidad de los monocitos humanos obtenidos, haciendo una dilución 1:1 de la muestra de células con azul tripan y contando las células en una cámara de Neubauer. También se determinó la pureza de la población obtenida por medio de citometría de flujo, a través del marcador específico de monocitos CD14; así como por tamaño y granularidad de la población obtenida.

#### ***4.3 Cultivo celular y diferenciación in vitro con vitamina D3***

Se cultivaron células THP-1 en medio RPMI 1640 complementado con 10% SFB inactivado por calor (60°C por 30 minutos), antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 µg/mL), glutamina, aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio al 1%.

Los monocitos humanos obtenidos a partir de sangre periférica, así como las células THP-1 se trataron con VD3 para inducir su diferenciación. Para esto, se colocaron  $3 \times 10^6$  células/mL en cajas Petri de 10 cm de diámetro, con VD3 a una concentración de 100 nM en medio RPMI complementado. Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Los tiempos de tratamiento fueron 24, 48 y 72 horas. Se mantuvo un control de células sin vitamina D3 para cada tiempo de tratamiento.

#### ***4.4 Estimulación celular e inmunoprecipitación***

Las células monocíticas se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/mL en medio RPMI 1640 sin complementar a 4°C. Las células se estimularon usando 30 µg de fragmentos F(ab)<sub>2</sub> anti-FcγRI y anti-FcγRII (32.2 y IV.3, provenientes de ratón) por 10 minutos a 4°C. Se centrifugaron en la picofuga con un pulso de 5 segundos, se resuspendieron en RPMI 1640 con 3% de SFB. La agregación de los receptores se indujo con 30 µg de fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de IgG anti-ratón que se incubaron a 37° por los tiempos indicados. La estimulación se detuvo adicionando 500 µL de TBS (10mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.4) a 4°C,

las células se centrifugaron en la picofuga con un pulso de 5 segundos, se retiró el sobrenadante. Las células se lisaron con 1 ml de solución de lisis (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM fenil-metil-sulfonil-fluoruro, 10 mM NaF y 1 mg/mL de Pepstatina A, Leupeptina y Aprotinina), y se mantuvieron a 4°C por 15 minutos. El lisado se centrifugó a 15000 g por 15 minutos a 4°C, descartándose el precipitado. Se cuantificó la proteína en el lisado por el método Bradford (Bio-Rad).

Para la inmunoprecipitación, los lisados se incubaron durante toda la noche a 4°C en agitación suave, con anticuerpos anti-Syk unidos a proteína A agarosa. Los inmunoprecipitados se lavaron 4 veces con solución amortiguadora de lavados (solución de lisis, pero con 0.1% de triton), y un último lavado realizado con agua más inhibidores (5 mM EDTA, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM fenil-metil-sulfonil-fluoruro, 10 mM NaF y 1 mg/mL de Pepstatina A, Leupeptina y Aprotinina). Finalmente, se adicionaron 25 µL de solución de muestra Laemmli y se hirvieron por 5 minutos. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su separación en gel SDS-PAGE al 10%. Se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa usando una cámara de transferencia semi-seca (Bio-Rad).

#### **4.5 Inmunoblots**

La membrana obtenida de la transferencia de proteínas se bloqueó durante toda la noche en solución amortiguadora de bloqueo (TBS-Tween 5%-BSA 3%) a 4°C. Después de hacer un lavado con TBS-T por 5 minutos, la membrana se incubó con el anticuerpo primario (anti-Syk, anti-SHP-1, anti-Grb2, anti-Cbl) o anti-pY-HRP por 90 minutos a temperatura ambiente. Después de realizar los lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a HRP por 30 minutos a temperatura ambiente. Para detectar la quimioluminiscencia en películas fotográficas, se usó el Kit Super Signal ECL (Pierce), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las bandas detectadas se digitalizaron con el Gel Doc 2000 System (Bio Rad) y se analizaron con el programa Bio Rad Quantity One. Los niveles de expresión de las proteínas fueron normalizados respecto al nivel de expresión de actina. Y los incrementos en la fosforilación o asociación

fueron normalizados respecto a los valores obtenidos en las células sin tratamiento con VD3 (tiempo cero) y sin estímulo.

Para eluir los anticuerpos de las membranas, estas fueron incubadas en solución amortiguadora de elusión (glicina 0.1M pH 2.5) por 90 minutos a 70°C. Después de los lavados, las membranas se bloquearon como se indica arriba.

#### **4.6 Tinción de plata**

Los inmunoprecipitados o los lisados celulares totales se separaron mediante electroforesis (SDS-PAGE al 10%). El gel de poliacrilamida se fijó toda la noche a 4°C en solución fijadora (MetOH-AcOH-H<sub>2</sub>O 50-12-18%). Después de lavar en una solución de EtOH al 30% por 20 minutos el gel se incubó por un minuto en una solución 0.02% de tiosulfato, protegido de la luz. Después de lavar con agua miliQ se incubó en solución de plata (AgNO<sub>3</sub> 2 mg/mL y formaldehído 0.75µL/mL) y se lavó de nuevo con agua miliQ. Se incubó en solución reveladora (0.18M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, formaldehído 0.0125%) hasta la aparición de las bandas, posteriormente se incubó con solución fijadora por 10 minutos.

#### **4.7 Ensayo de inmunofluorescencia**

Las células se resuspendieron a una densidad de 1x10<sup>6</sup> células/mL en solución amortiguadora de lavados (PBS, 5% SFB y 0.1% de azida de sodio). Se colocaron 300 000 células por tubo (Tubos Falcon de poliestireno). Se adicionaron 10 µg de uno de los siguientes anticuerpos: anti-receptor FcγRI (32.2), FcγRII (IV.3), anti-DNP IgG1 (2C5), anti DNP IgG2b (4F8), y se incubaron las células con el anticuerpo por 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron 3 veces adicionando 300 µL de solución de lavados y centrifugando a 200 g por 3 minutos. Después de realizar los lavados, las células se incubaron con el segundo anticuerpo, anti-IgG FITC 7.5 µg/ml o las cantidades indicadas por el fabricante de CD14-FITC y CR3-PE (Pharmingen) por 30 minutos protegidos de la luz. Las células se lavaron 2 veces con solución de lavados y una vez con PBS. Las células se fijaron con paraformaldehído al 1% en PBS por 20 minutos. Finalmente las células se lavaron

tres veces y se resuspendieron en PBS. Se analizó la fluorescencia de 10,000 células en el citómetro de flujo (FACS Scan, Becton Dickinson). Los datos fueron evaluados de acuerdo al porcentaje de células positivas para el marcador, tomando en cuenta los controles de isotipo como negativos ( $\cong 90\%$  de las células). El valor de intensidad media de fluorescencia de las células positivas también se evaluó. Los resultados fueron expresados como número de incrementos respecto al valor control (sin estímulo, sin VD3). La significancia estadística fue evaluada por una prueba t-Student, las diferencias fueron consideradas como significativas cuando  $p < 0.05$ .

## **Capítulo 5**

### **RESULTADOS**

#### **5.1 El tratamiento con VD3 induce la diferenciación de células THP-1 y MHSP**

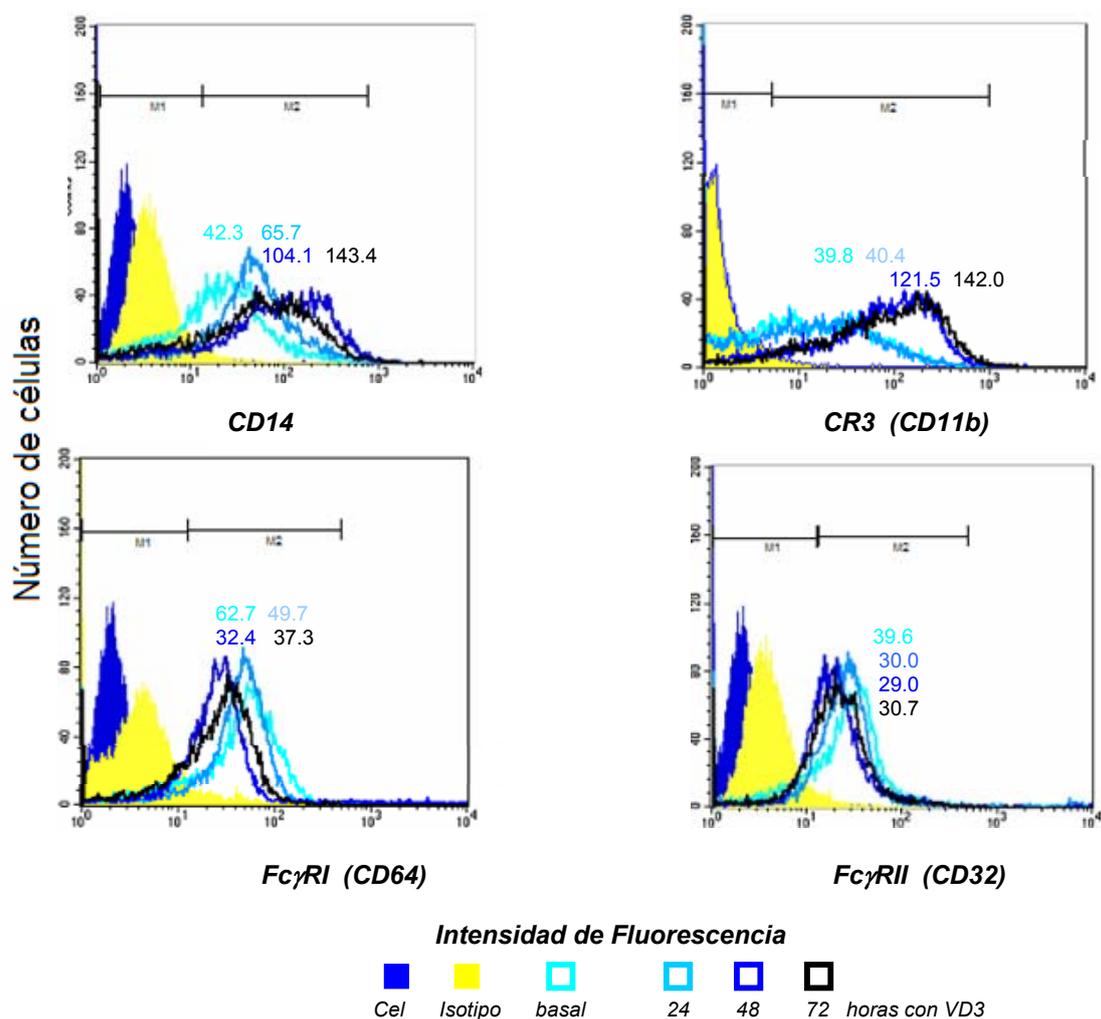
Para verificar la diferenciación de las células THP-1 y de los MHSP (monocitos humanos de sangre periférica) inducidos por el tratamiento con VD3, se determinaron cambios en el nivel de expresión de los receptores CD14 y CR3, los cuales son usados como marcadores de diferenciación en monocitos/macrófagos. También se determinó el nivel de expresión de los Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII por citometría de flujo a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento (Figs 5.1 y 5.2).

Los niveles de expresión de CD14 y CR3 aumentaron significativamente en las células THP-1 a los tres tiempos de tratamiento, hasta más de 9 veces para las 72 horas de tratamiento con VD3 (Fig 5.3 A, B). Estos datos concuerdan con los reportados en la literatura (Agramonte et al, 2003; Martínez, 2002; Ziegler y Ulevitch, 1993) en donde se asocia un aumento en la expresión de CD14 y CR3 con la diferenciación de los monocitos hacia un estadio más maduro.

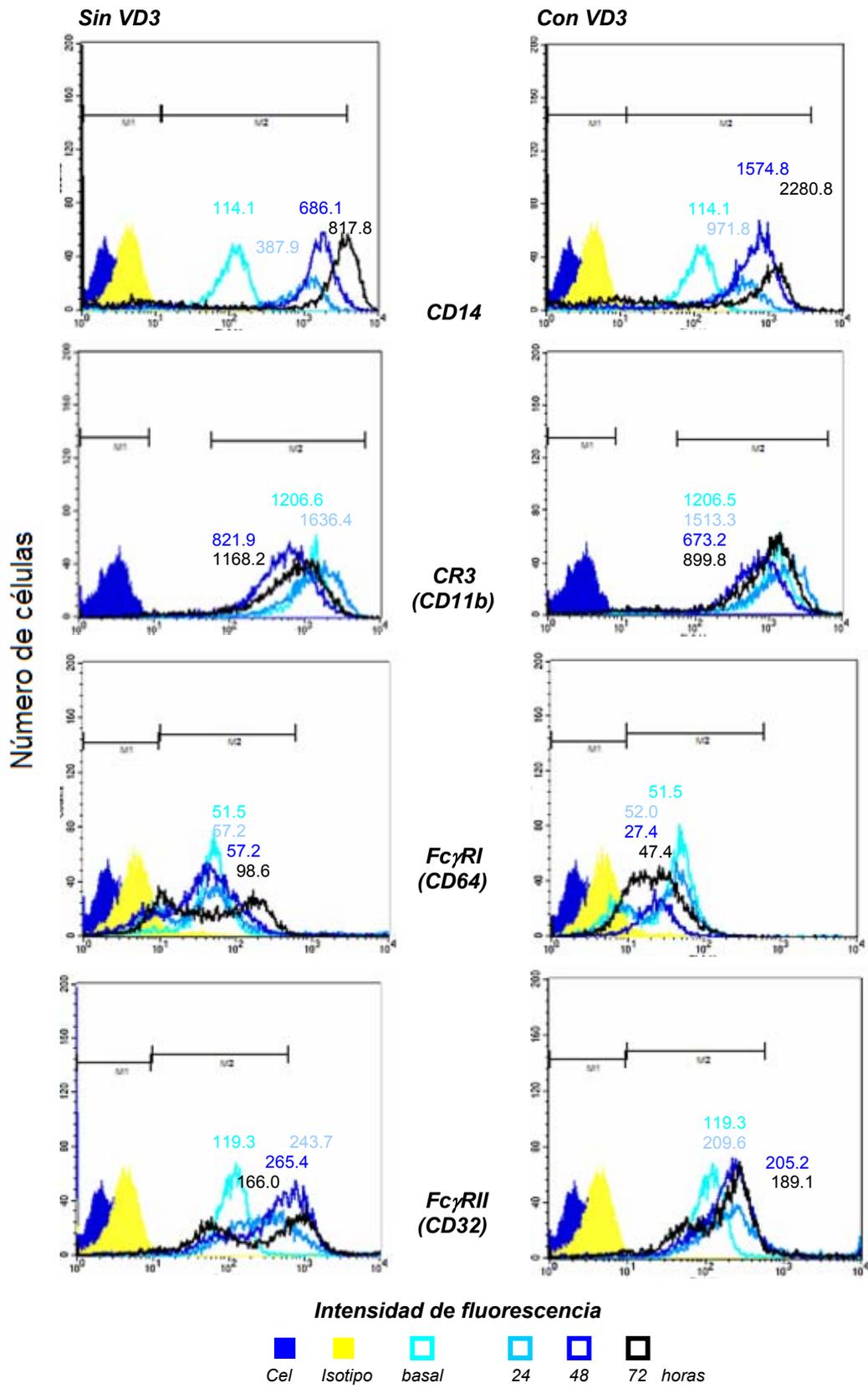
También se observó que durante la diferenciación de células THP-1, los porcentajes y los niveles de expresión de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII no cambiaron significativamente (Fig 5.3 C, D).

En cuanto a los MHSP, el nivel de expresión de CD14 aumentó de manera significativa desde las 24 horas en cultivo sin VD3 respecto a los niveles de expresión basales. Este aumento en la expresión de CD14 fué significativamente mayor en los MHSP que estuvieron en presencia de VD3 durante el cultivo, 3.5 veces sin VD3 y 13.5 veces con VD3 (Figs 5.2 y 5.4 A). Esto indicó que hubo un aumento en la expresión de CD14 debido al tratamiento con VD3. El nivel de expresión de CR3 (CD11b) tuvo una ligera disminución en MHSP con y sin VD3, la cual fué significativa a las 24 horas en los MHSP con y sin VD3, y a las 48 horas sin VD3. A las 72 horas la expresión se fué reestableciendo y no tuvo cambios significativos respecto a los niveles basales (Fig 5.4 B)

El nivel de expresión del Fc $\gamma$ RI en los MHSP disminuyó ligeramente pero tuvo significancia estadística a las 24 y 48 horas de tratamiento con VD3; a las 72 horas de tratamiento no hubo diferencias significativas respecto a los niveles basales. En cuanto al nivel de expresión del Fc $\gamma$ RII, se observó un aumento en la expresión (1.6 veces) a las 72 horas, y fué significativa la expresión en los MHSP tratados con VD3 (2.2 veces) (Fig 5.4 C y D).

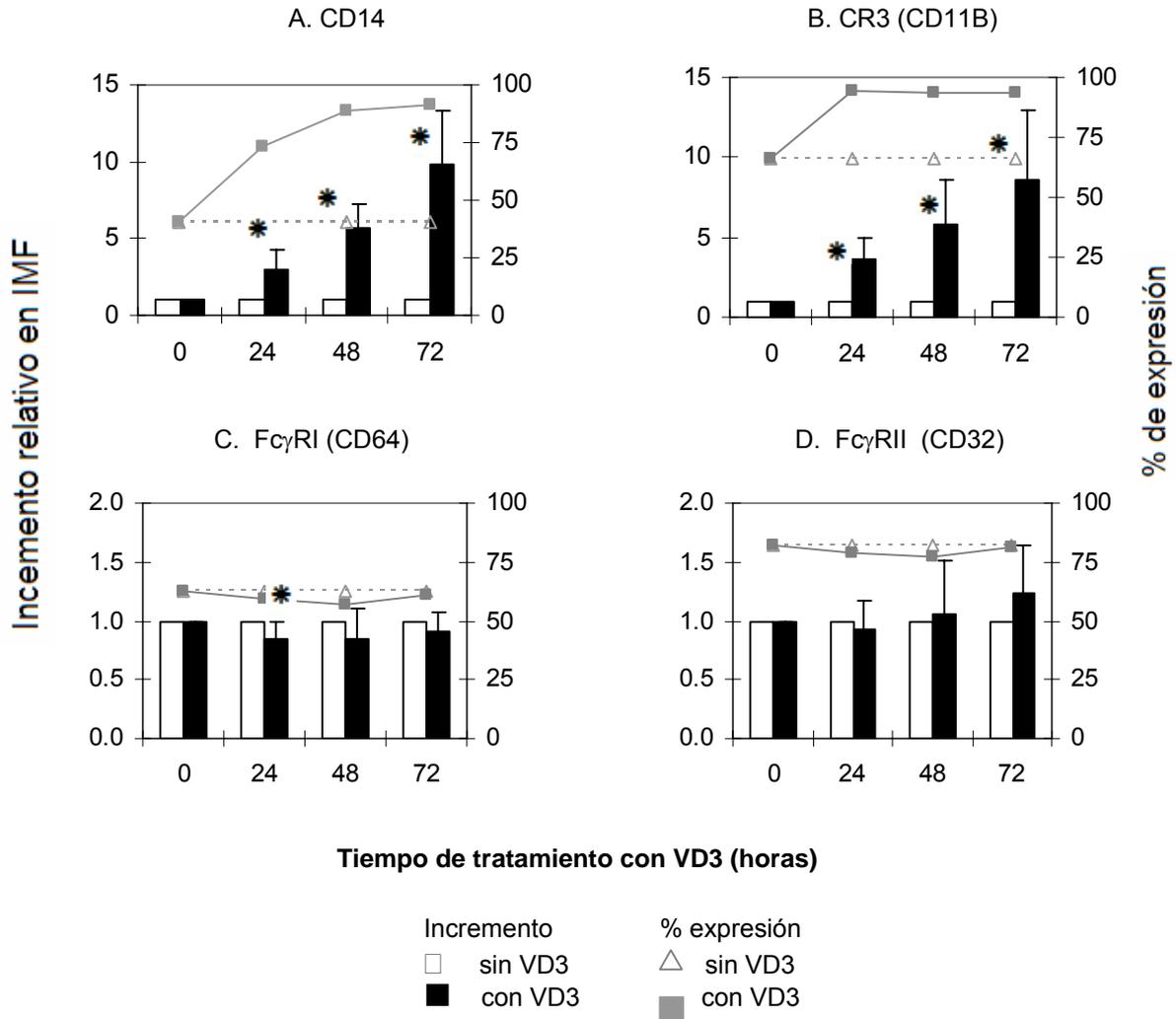


**Fig 5.1** Análisis por citometría de flujo de la expresión de los receptores CD14, CR3 (CD11b), Fc $\gamma$ RI (CD64) y Fc $\gamma$ RII (CD32) en células THP-1. Se muestran histogramas representativos en células THP-1 teñidas con los respectivos anticuerpos después de 24, 48 y 72 horas de tratamiento con VD3 y se indica la intensidad media de fluorescencia de cada tiempo de la región positiva (M2). Las preparaciones fueron teñidas con anticuerpos anti-Fc $\gamma$ RI (32.2) o anti-Fc $\gamma$ RII (IV.3) de ratón, y una IgG anti-ratón-FITC como anticuerpo secundario. El marcaje de CD14 y CR3 se realizó con anti-CD14-FITC y anti-CR3-PE.

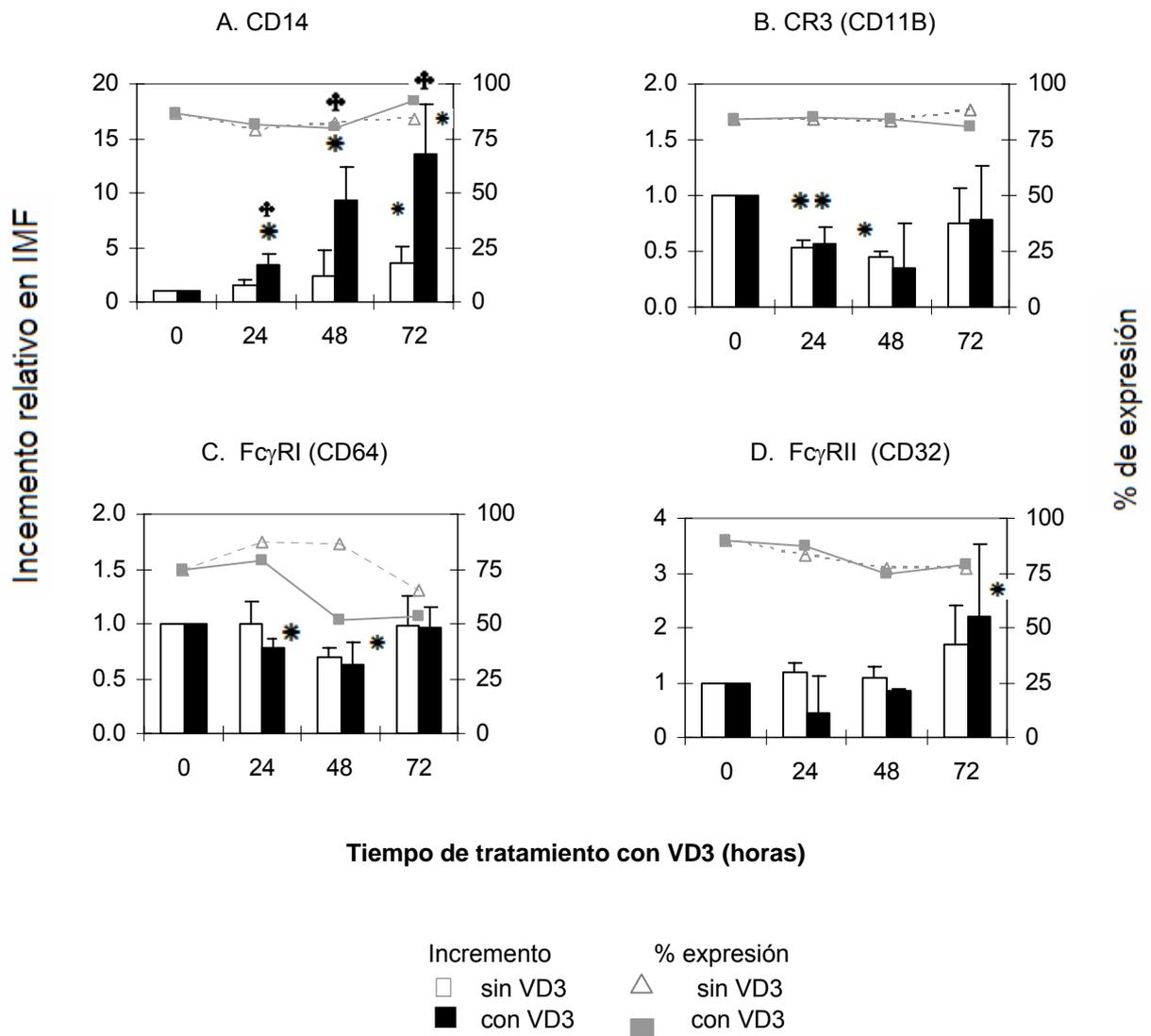


(Fig. 5.2)

**Fig 5.2 Análisis por citometría de flujo de la expresión de los receptores CD14, CR3 (CD11b), Fc $\gamma$ RI (CD64) y Fc $\gamma$ RII (CD32) en MHSP.** Se muestran histogramas representativos de MHSP teñidos con los respectivos anticuerpos después de 24, 48 y 72 horas de tratamiento con VD3 y se indica la intensidad media de fluorescencia de cada tiempo de la región positiva (M2). Las preparaciones fueron teñidas con anticuerpos anti-Fc $\gamma$ RI (32.2) o anti-Fc $\gamma$ RII (IV.3) de ratón, y una IgG anti-ratón-FITC como anticuerpo secundario. El marcaje de CD14 y CR3 se realizó con anti-CD14-FITC y anti-CR3-PE. Los datos son reportados como porcentaje de células positivas, con una intensidad media de fluorescencia obtenida de las células que fueron marcadas como positivas.



**Fig 5.3 Nivel de expresión de los receptores CD14, CR3, Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII en células THP-1.** En el gráfico se muestra el promedio del incremento relativo en IMF (intensidad media de fluorescencia) de la expresión del marcador  $\pm$  D.E. a las 0, 24, 48 y 72 horas de tratamiento con VD3. El valor asignado corresponde al promedio obtenido al dividir el valor de la IMF del receptor al tiempo indicado entre la IMF basal del receptor. Se determinaron los niveles expresión de CD14 (n=6) y CR3 (n=4), el Fc $\gamma$ RI (n=7) y Fc $\gamma$ RII (n=9). \* Indica una diferencia significativa en el incremento de expresión del receptor ( $p < 0.05$ ) comparado con las células no tratadas. También se muestra el promedio del porcentaje de células que están expresando el marcador (% de expresión).



**Fig 5.4 Nivel de expresión de los receptores CD14, CR3, Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII en MHSP.** En el gráfico se muestra el promedio del incremento relativo en IMF (intensidad media de fluorescencia) de la expresión del marcador  $\pm$  D.E. a las 0, 24, 48 y 72 horas de tratamiento con VD3. El valor asignado corresponde al promedio obtenido al dividir el valor de la IMF del receptor al tiempo indicado entre la IMF basal del receptor. Se determinaron los niveles expresión de CD14 (n=3) y CR3 (n=3), el Fc $\gamma$ RI (n=4) y Fc $\gamma$ RII (n=4). \* Indica una diferencia significativa en el incremento de expresión del receptor ( $p < 0.05$ ) comparado con las células no tratadas. También se muestra el promedio del porcentaje de células que están expresando el marcador (% de expresión). ♣ Indica una diferencia significativa en el incremento en las células tratadas con VD3 ( $p < 0.05$ ) comparado con las células sin tratamiento al tiempo indicado. También se muestra el promedio del porcentaje de células que están expresando el marcador (% de expresión).

Al final del tratamiento con VD3 por 72 horas los MHSP permanecieron adheridos a la superficie de cultivo, fueron de mayor tamaño y de formas irregulares (datos no mostrados). La morfología observada correspondió a la reportada en macrófagos, de esta manera se corroboró que la VD3 indujo la diferenciación de los monocitos hacia un estadio más maduro (de macrófago).

De esta manera pudimos reproducir los cambios observados en la diferenciación de los monocitos de la línea THP-1 y en MHSP hacia un fenotipo más diferenciado (a macrófago).

### **5.2 Syk se fosforila tras la agregación de los receptores $Fc\gamma RI$ o $Fc\gamma RII$**

La fosforilación de Syk es una respuesta temprana tras la agregación de los  $Fc\gamma Rs$ . De manera que decidimos evaluar el nivel de fosforilación de Syk dependiente de la agregación de los receptores  $Fc\gamma RI$  y  $Fc\gamma RII$  en células THP-1 y en MHSP. En experimentos realizados anteriormente en nuestro laboratorio se determinó que 3 minutos de estimulación con 10  $\mu g$  de los  $F(ab)'_2$  de los anticuerpos primarios (anti  $Fc\gamma RI$  y anti  $Fc\gamma RII$ ) y secundarios (anti IgG), son las condiciones a las cuales se obtiene el nivel máximo de fosforilación de Syk después de la agregación de los  $Fc\gamma RI$  o  $Fc\gamma RII$ . Así que para poder realizar una comparación sobre el nivel de fosforilación de Syk en los MHSP, se emplearon las mismas cantidades de anticuerpos primarios y secundarios a diferentes tiempos.

Para obtener la cinética de fosforilación de Syk,  $3 \times 10^6$  células fueron incubadas con fragmentos  $F(ab)'_2$  de anticuerpos IgG anti-receptor  $Fc\gamma RI$  (32.2) o  $Fc\gamma RII$  (IV.3). Posteriormente, los receptores fueron agregados usando fragmentos  $F(ab)'_2$  de anticuerpos anti-IgG de ratón, por 0,1, 3, 5, 10, 15 y 30 minutos. Se realizaron los inmunoblots anti-pY y anti-Syk y se cuantificaron las bandas por densitometría, como se indica en métodos.

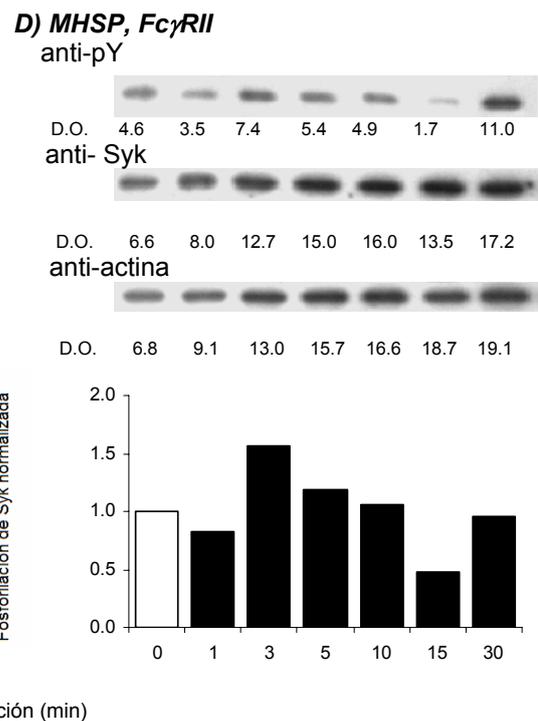
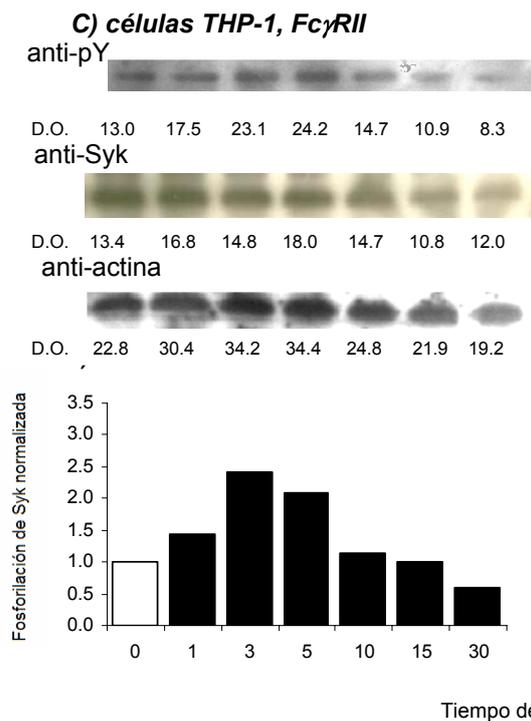
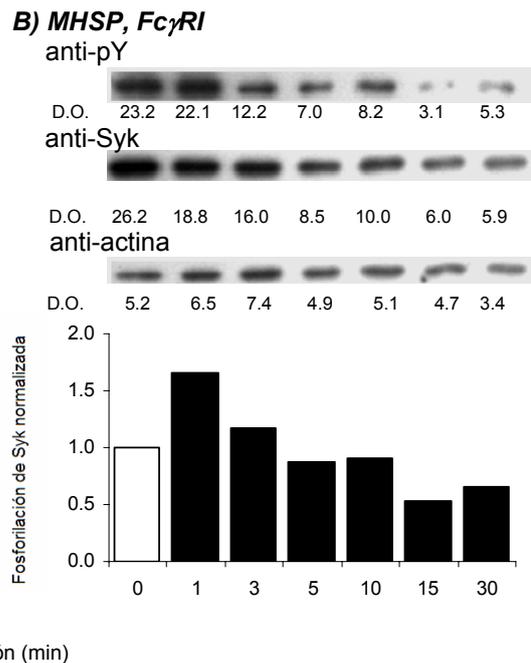
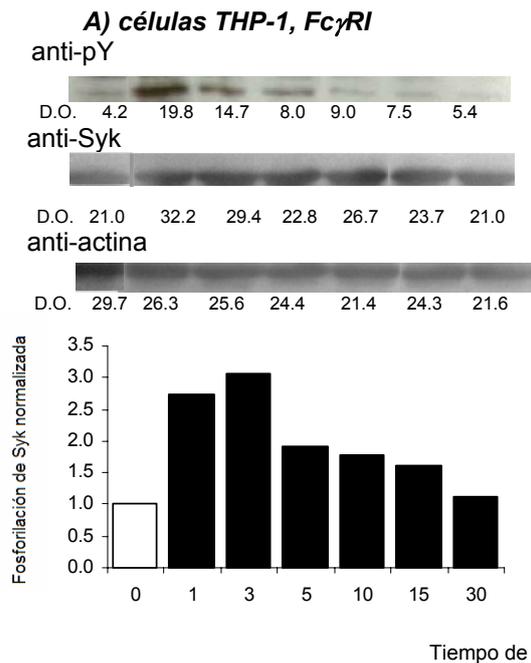
En células THP-1 estimuladas a través de la agregación del  $Fc\gamma RI$  se observó un pico máximo de fosforilación de Syk al tercer minuto de estimulación (aumentó 3 veces), y conforme pasó el tiempo esta fosforilación fué disminuyendo

(Fig 5.5 A). En los MHSP se observó el pico de fosforilación al primer minuto (aumentó 1.6 veces), al tercer minuto aún se observó una fosforilación mayor a la basal, después de ese tiempo la fosforilación disminuyó, llegando a niveles incluso menores al basal (fig 5.5 B). En las células THP-1 y en MHSP estimulados a través del Fc $\gamma$ RII, el pico de fosforilación se observó a los tres minutos (aumentó 2.4 y 1.7 veces respectivamente) (Fig 5.5 C y D). El nivel de fosforilación inducido a través del Fc $\gamma$ RII fué menor al obtenido cuando se estimularon las células a través del Fc $\gamma$ RI en las células THP-1, y la fosforilación en MHSP fué menor que en las células THP-1.

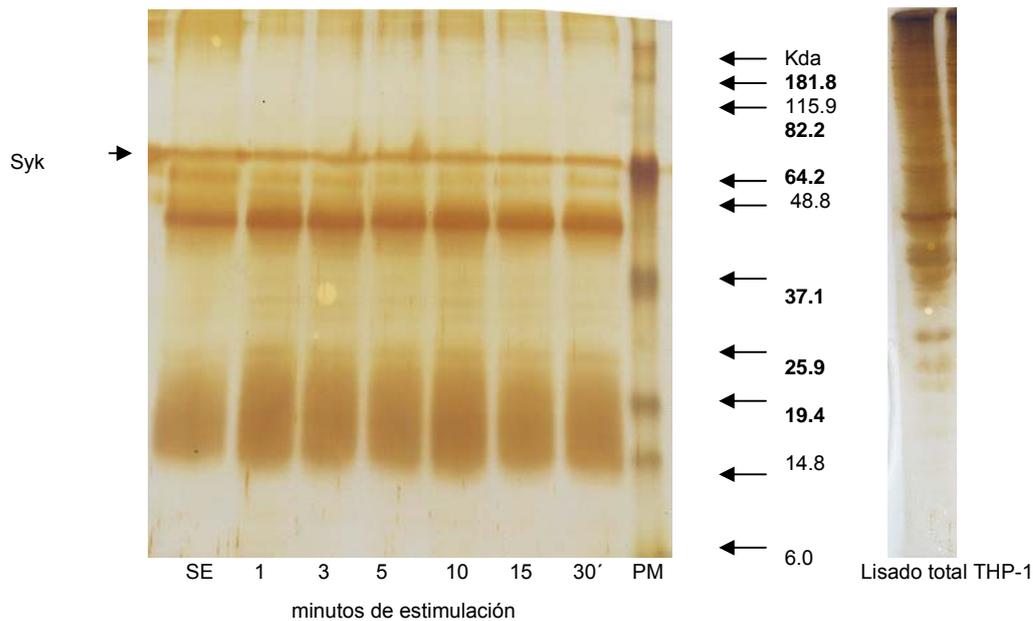
Considerando que la máxima fosforilación de Syk en las células THP-1 fué a los tres minutos y que en los MHSP al primer y tercer minuto se observó un nivel de fosforilación alto, se decidió usar el tiempo de estimulación de tres minutos para ambos tipos de células.

Se estimularon células THP-1 a través de la agregación del Fc $\gamma$ RI a diferentes tiempos, y del lisado obtenido se inmunoprecipitó a Syk. Las proteínas del inmunoprecipitado se separaron en un gel SDS-PAGE, y se visualizaron mediante una tinción de plata con el fin de tener un patrón general de las proteínas que inmunoprecipitaron con Syk (Fig 5.6).

La cantidad de Syk inmunoprecipitada fué la misma en cada uno de los carriles (Fig 5.6). En el gel se apreciaron bandas (40-20 kDa) que aparecieron en las células estimuladas y se fueron desvaneciendo conforme pasó el tiempo de estimulación, en las células no estimuladas estas bandas no se observaron. Las bandas parecen corresponder a proteínas que co-inmunoprecipitan con Syk tras la estimulación, y que no lo hacen cuando las células no están estimuladas.



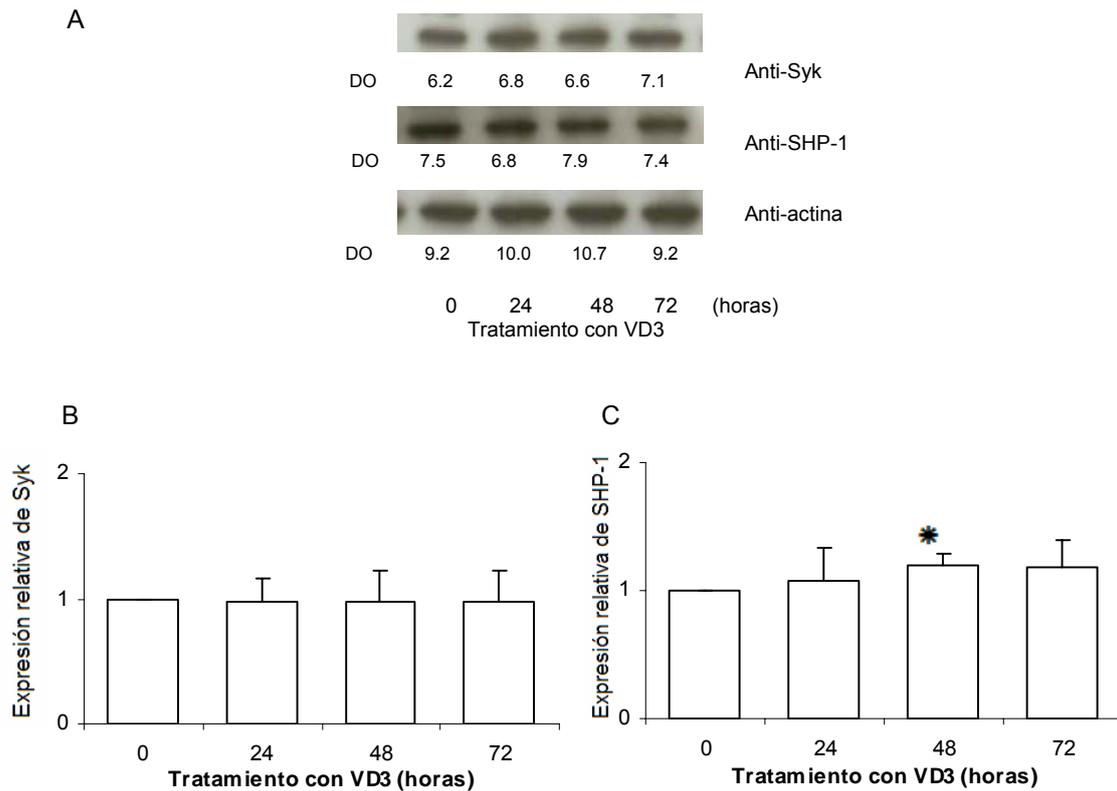
**Fig. 5.5 Determinación de fosforilación de Syk en inmunoblots de lisados de células estimuladas a diferentes tiempos a través del receptor Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII.** Se estimularon  $3 \times 10^6$  células THP-1 y MHSP usando fragmentos F(ab) $'_2$  del anticuerpo anti-Fc $\gamma$ RI y anti-Fc $\gamma$ RII de ratón, se agregaron los receptores usando fragmentos F(ab) $'_2$  anti-ratón y se incubaron las células por los tiempos de estimulación indicados. Las células se lisaron y los lisados fueron sometidos a SDS-PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Se realizó el blot antifosfotirosina y posteriormente se detectaron Syk y actina. La intensidad en la fosforilación de Syk se obtuvo al dividir la intensidad de la banda al tiempo indicado entre el valor de la intensidad de la banda del tiempo 0. Se muestra el valor de la densidad óptica (D.O.) de cada una de las bandas.



**Fig 5.6 Tinción de plata de un gel de poliacrilamida de la inmunoprecipitación de Syk.** Se lisaron  $3 \times 10^6$  células THP-1 y se inmunoprecipitó a Syk, el carril 1 corresponde a células sin estimular (SE), en los restantes se muestran el tiempo de estimulación de 1, 3, 5, 10, 15 y 30 minutos. La estimulación se realizó usando un anti-Fc $\gamma$ RI (32.2) seguida de la utilización de F(ab) $_2$  anti-IgG de ratón producido en chivo.

### **5.3 El tratamiento con VD3 en células THP-1 no modifica la expresión de Syk y SHP-1**

Para determinar si el tratamiento con VD3 modifica el nivel de expresión de Syk y SHP-1, se determinó el nivel de expresión por inmunoblot en lisados de células THP-1 a las 0, 24, 48 y 72 horas de tratamiento con y sin VD3. Los lisados se corrieron en geles SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Los blots se revelaron por quimioluminiscencia y la intensidad de las bandas capturadas se analizó usando el software Bio Rad Quantity One. Para obtener los niveles de expresión se dividió el valor de la intensidad de la banda de cada proteína entre el valor de la intensidad de la banda de actina. El valor obtenido a cada tiempo de tratamiento se dividió entre el valor obtenido al tiempo cero (Fig 5.7 A).



**Fig 5.7 Nivel de expresión de Syk, SHP-1 y actina en células THP-1 durante el tratamiento con VD3 por 0, 24, 48 y 72 horas.** Células THP-1 se trataron con VD3 por el tiempo indicado. Syk, SHP-1 y actina se determinaron por Western blot, se muestra un experimento representativo indicando el valor de la densidad óptica (D.O.) de cada una de las bandas (A). Se muestran los gráficos que corresponden al promedio  $\pm$  D.E. del nivel de expresión de Syk y SHP-1 (B y C). El valor promedio obtenido ( $n=8$ ) se cuantificó al dividir la intensidad de la banda al tiempo indicado entre el valor de la intensidad de la banda del tiempo 0. \* Indica una diferencia significativa en la expresión ( $p < 0.05$ ) comparado con las células sin tratamiento con VD3.

Se observó un ligero aumento, aunque con significancia estadística, en la expresión de SHP-1 a las 48 horas de tratamiento. En los demás tiempos no se observaron diferencias significativas en el nivel de expresión de Syk y SHP-1 durante el tratamiento con VD3 en las células THP-1 (Fig 5.7 B y C).

Estos resultados indican que VD3 no modula la expresión de Syk y de SHP-1.

#### **5.4 Nivel de fosforilación de Syk y su asociación con SHP-1 tras la agregación del Fc $\gamma$ RI en células THP-1 tratadas con VD3**

Para determinar la asociación de Syk con SHP-1 y su dependencia del nivel de fosforilación de Syk; se inmunoprecipitó Syk a las 0, 24, 48 y 72 horas de

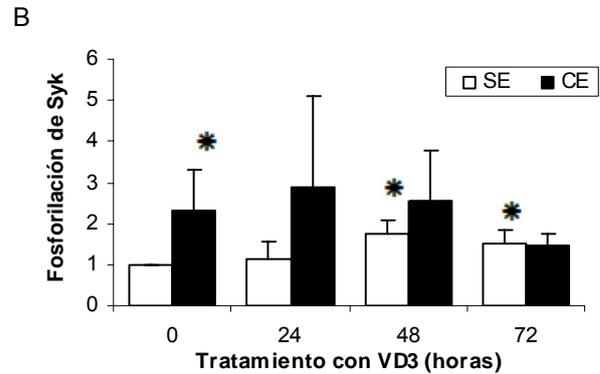
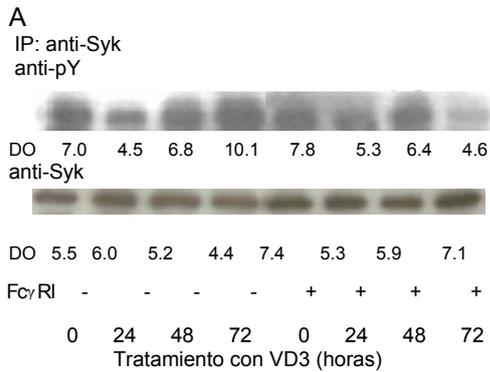
tratamiento con VD3, en células estimuladas o sin estimular a través de los receptores Fc $\gamma$ R. Se realizó un Western blot anti-fosfotirosina y se reveló usando anticuerpos anti-PY-HRP. Después de eluir los anticuerpos del blot, se volvió a bloquear la membrana y se realizaron inmunoblots anti-Syk y anti-SHP-1 en la misma membrana. Los resultados se muestran en la Fig 5.8.

El nivel basal de fosforilación de Syk en las células THP-1 tratadas con VD3 tuvo un aumento significativo de 1.7 y 1.5 veces a las 48 y 72 horas de tratamiento respecto a las células sin tratamiento. Cuando las células diferenciadas con VD3 fueron estimuladas a través de la agregación del Fc $\gamma$ RI, se observó un aumento significativo de 2.3 veces en la fosforilación de Syk en células sin tratamiento (tiempo cero), y un aumento a las 24 horas de tratamiento. En las células con 48 horas de tratamiento este aumento fue menor, y en células tratadas por 72 horas ya no hubo aumento (Fig 5.8 B).

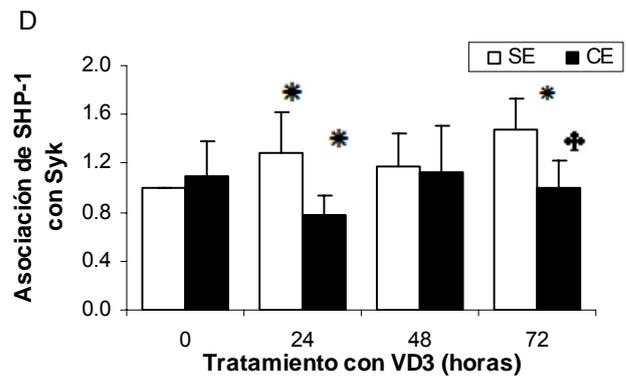
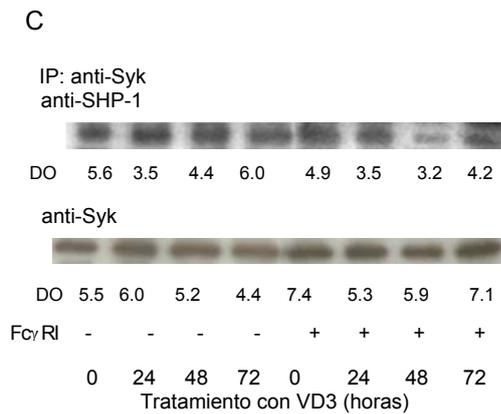
El nivel de asociación basal de SHP-1 con Syk mostró un aumento gradual en las células que recibieron el tratamiento con VD3, y fue significativo a las 24 y 72 horas (1.3 y 1.5 veces respectivamente) (Fig 5.8 D, barras blancas). Mientras que en células no tratadas, la estimulación a través del Fc $\gamma$ RI no presentó cambios en el nivel de asociación de SHP-1 con Syk, sí se observó que la agregación del Fc $\gamma$ RI indujo una disminución en el nivel de asociación de SHP-1 con Syk en células tratadas por 24 y 72 horas (Fig 5.8 D, barras negras).

En resumen, la diferenciación de las células THP-1 con VD3 indujo un aumento en la fosforilación basal de Syk y en su asociación con SHP-1. Tras la agregación del Fc $\gamma$ RI la fosforilación de Syk aumentó (2.3 veces), pero fue disminuyendo hasta no mostrar cambios (como en las células sin el receptor agregado a las 72 horas); y la asociación de Syk con SHP-1 no cambió.

**Estimulación a través del Fc $\gamma$ RI**  
**Nivel de fosforilación de Syk**



**Nivel de asociación de SHP-1 con Syk**



**Fig 5.8 Nivel de fosforilación de Syk, y nivel de asociación de SHP-1 con Syk de células THP-1 durante el tratamiento con VD3 por 0, 24, 48 y 72 horas y estimuladas a través de Fc $\gamma$ RI.** (A, C) Se inmunoprecipitó Syk de lisados celulares obtenidos de células THP-1 a diferentes tiempos de tratamiento. Por Western blot se determinó Syk fosforilada, Syk y SHP-1, se muestra un experimento representativo indicando el valor de la densidad óptica (D.O.) de cada una de las bandas. (B, D) Se muestran los gráficos que corresponden al promedio  $\pm$  D.E. del nivel de fosforilación de Syk en la inmunoprecipitación de Syk (SE n=8, CE n=5) y del nivel de asociación de SHP-1 con Syk (SE n=7, CE n=4) en células sin estímulo (SE) y con estímulo (CE). \* Indica una diferencia significativa en la estimulación ( $p < 0.05$ ) comparado con las células no estimuladas y sin tratamiento con VD3. † Indica una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) comparando células con y sin estímulo tratadas por el tiempo indicado.

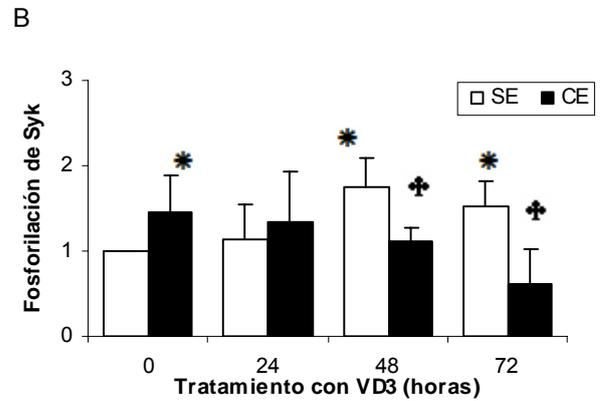
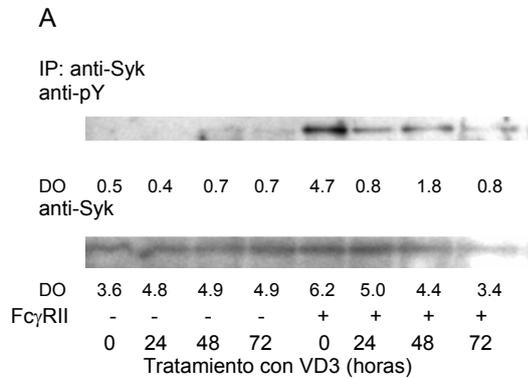
### **5.5 El nivel de fosforilación de Syk disminuye y el nivel de asociación de Syk con SHP-1 aumenta cuando se agrega el Fc $\gamma$ RII en las células THP-1 tratadas con VD3**

La diferenciación de las células THP-1 indujo un aumento similar en la fosforilación de Syk y en su asociación con SHP-1 (1.5 veces). Cuando las células fueron estimuladas a través de la agregación del Fc $\gamma$ RII, hubo un aumento significativo de 1.5 veces en la fosforilación de Syk en células sin tratar. En células tratadas por 24 horas con VD3 este aumento fué menor, y en células tratadas por 48 y 72 horas la estimulación a través del Fc $\gamma$ RII indujo una disminución significativa en el nivel de fosforilación de Syk (1.1 y 0.6 veces respectivamente) (Fig 5.9 B).

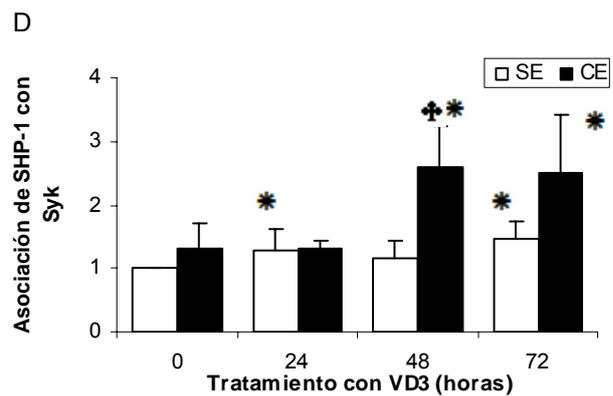
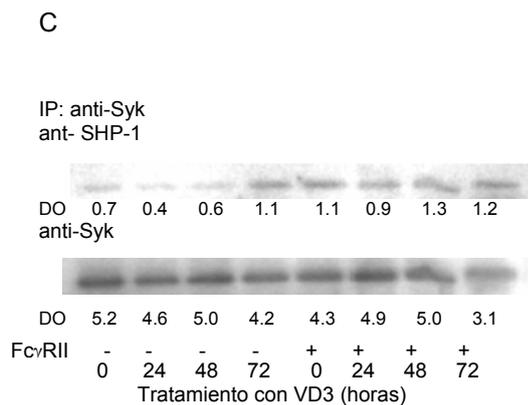
El nivel de asociación basal de SHP-1 con Syk mostró un ligero aumento en las células que recibieron el tratamiento con VD3, y fué significativo a las 24 y 72 horas (1.2 y 1.5 veces respectivamente) (Fig 5.9 D barras blancas). En células THP-1 no tratadas o tratadas por 24 horas con VD3, la agregación del Fc $\gamma$ RII no indujo cambios en la asociación de SHP-1 con Syk. Sin embargo, en células tratadas por 48 y 72 horas la agregación del Fc $\gamma$ RII indujo un aumento significativo en la asociación entre estas dos proteínas (2.6 y 2.5 veces respectivamente) (Fig 5.9 D, barras negras).

En conclusión, tras la agregación del Fc $\gamma$ RII se observa una disminución gradual en el nivel de fosforilación de Syk y un aumento en su asociación con SHP-1 en las células THP-1 diferenciadas con VD3. Dado que la VD3 no modula la expresión de Syk y SHP-1, las diferencias observadas en el nivel de fosforilación de Syk así como su asociación con SHP-1, no se deben a la cantidad disponible de proteína, sino a la agregación del receptor Fc $\gamma$ RII.

***Estimulación a través del FcγRII***  
***Nivel de fosforilación de Syk***



***Nivel de asociación de SHP-1 con Syk***



**Fig 5.9 Nivel de fosforilación de Syk, y nivel de asociación de SHP-1 con Syk de células THP-1 durante el tratamiento con VD3 por 0, 24, 48 y 72 horas y estimuladas a través de FcγRII.** (A, C) Se inmunoprecipitó Syk de lisados celulares obtenidos de células THP-1 a diferentes tiempos de tratamiento. Por Western blot se determinó Syk fosforilada, Syk y SHP-1, se muestra un experimento representativo indicando el valor de la densidad óptica (D.O.) de cada una de las bandas (B, D). Se muestran los gráficos que corresponden al promedio  $\pm$  D.E. del nivel de fosforilación de Syk en la inmunoprecipitación de Syk (SE n=8, CE n=5) y del nivel de asociación de SHP-1 con Syk (SE n=7, CE n=3) en células sin estímulo (SE) y con estímulo (CE). \* Indica una diferencia significativa en la estimulación ( $p < 0.05$ ) comparado con las células no estimuladas y sin tratamiento con VD3. † Indica una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) comparando células con y sin estímulo tratadas por el tiempo indicado.

### **5.6 El nivel de expresión de las moléculas adaptadoras Cbl y Grb2 no cambia en las células THP-1 tratadas con VD3.**

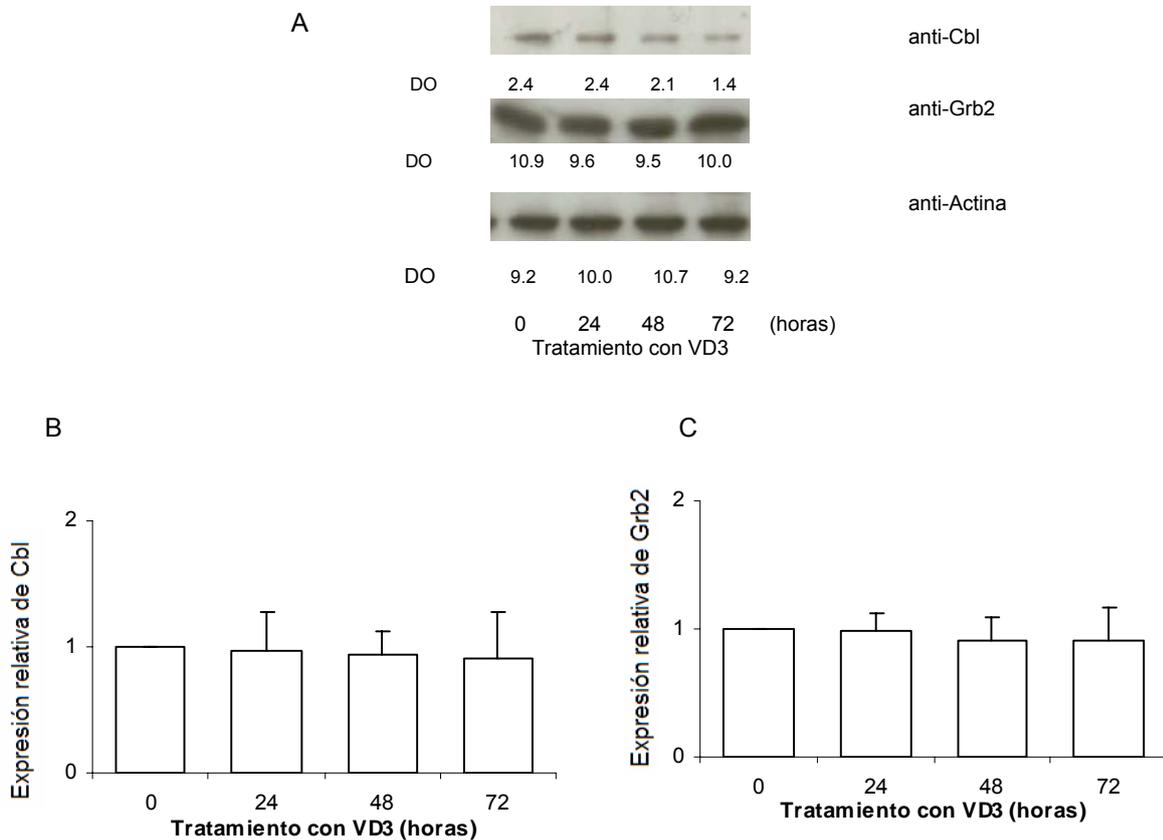
El nivel de expresión de Cbl y Grb2 se determinó partiendo de lisados de células THP-1 y MHSP a las 0, 24, 48 y 72 horas de tratamiento con y sin VD3. Los blots analizados correspondieron a los mismos que se analizaron en la determinación del nivel de expresión de Syk y SHP-1; se revelaron por quimioluminiscencia y la intensidad de las bandas capturadas se analizó usando el software Quantity One (Bio Rad). Para obtener un valor cuantitativo de los niveles de expresión se dividió el valor de la intensidad de la banda de cada proteína entre el valor de la intensidad de la banda de actina. El valor obtenido a cada tiempo de tratamiento se dividió entre el valor obtenido al tiempo cero (Fig 5.10 A).

No se observaron diferencias significativas en cuanto el nivel de expresión de Cbl y Grb2 en las células THP-1 durante el tratamiento con VD3 (Fig 5.10 B y C), por lo que concluimos que la VD3 no modula la expresión de Grb2 y Cbl.

### **5.7 Cbl y Grb2 están asociadas a Syk en células THP-1, y el nivel de asociación no cambia cuando las células son estimuladas a través del Fc $\gamma$ RII**

La actividad de Syk determina la activación de varias moléculas involucradas en la señalización intracelular. Observamos que la agregación de los receptores Fc $\gamma$ RI o Fc $\gamma$ RII indujo la fosforilación de Syk, pero en las células diferenciadas con VD3, la agregación de estos no cambió o disminuyó el estado de fosforilación de Syk, y la asociación de SHP-1 con Syk fué diferente para cada uno de los receptores. Con el fin de determinar si los complejos de señalización que inicialmente se forman tras la agregación de los receptores Fc $\gamma$ RI o Fc $\gamma$ RII son diferentes en cuanto a la participación de otras proteínas en esta interacción, se determinó estudiar el papel de la adaptadora Grb2 y de la adaptadora con actividad de ligasa de ubiquitina E3, Cbl. Se ha encontrado a SHP-1 asociada a la adaptadora Grb2, y por otra parte se ha demostrado que Cbl participa en la regulación negativa de Syk y que se asocia con esta. Para determinar la participación Grb2 y Cbl en el complejo de activación de Syk tras la agregación del

Fc $\gamma$ RI y del Fc $\gamma$ RII, de los experimentos realizados para la determinación del nivel de fosforilación de Syk y su asociación con SHP-1, también se determinó a Cbl y Grb2.



**Fig. 5.10 Nivel de expresión de Cbl y Grb2 en células THP-1 durante el tratamiento con VD3.** Células THP-1 se trataron con VD3 por 24, 48 y 72 horas. Cbl, Grb2 y actina se determinaron por Western blot, se muestra un experimento representativo indicando el valor de la densidad óptica (D.O.) de cada una de las bandas (A). Se muestran los gráficos que corresponden al promedio  $\pm$  D.E. del nivel de expresión de Cbl y Grb2 (B y C). El valor promedio obtenido ( $n=8$ ) se cuantificó al dividir la intensidad de la banda al tiempo indicado entre el valor de la intensidad de la banda del tiempo 0.

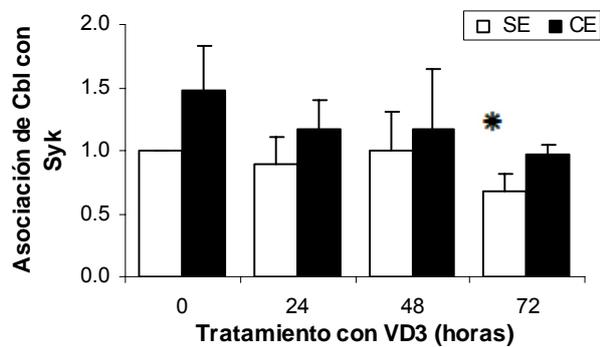
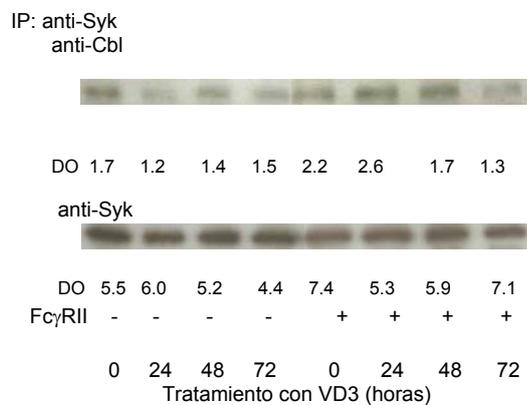
En condiciones basales, hubo asociación de Cbl y Grb2 con Syk. El nivel de asociación de Cbl con Syk tuvo una disminución ligera, aunque significativa (0.2 veces) a las 72 horas de tratamiento con VD3. Cuando las células THP-1 fueron estimuladas a través del receptor Fc $\gamma$ RI se observó un aumento en la asociación de Cbl con Syk tanto en células sin tratamiento como en células tratadas por 24 y 48 horas, y luego disminuyó hasta niveles basales a las 72 horas de tratamiento

con VD3, pero estos cambios no fueron significativos (Fig 5.11 a). En células estimuladas a través del Fc $\gamma$ RII se observó un aumento en el nivel de asociación de Cbl con Syk, el cual fué significativo a las 24 y 72 horas de tratamiento con VD3 entre las células estimuladas y no estimuladas a ese tiempo de tratamiento (1.5 y 1.4 veces respectivamente) (Fig 5.11 c).

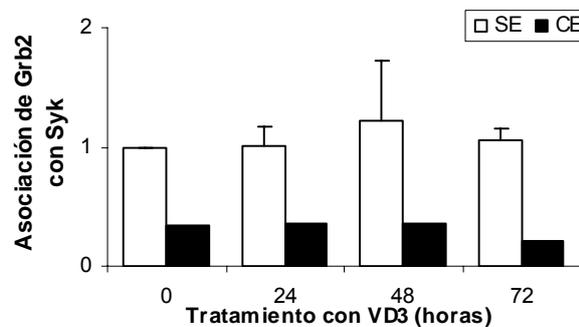
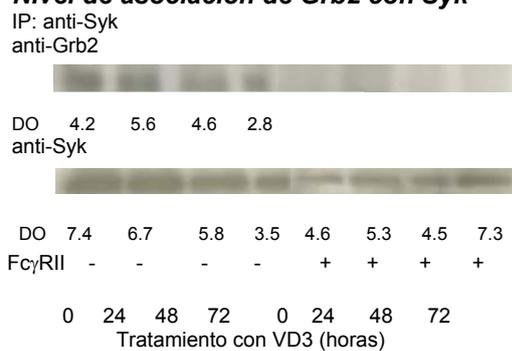
La asociación de Grb2 con Syk no cambió por el tratamiento con VD3. Sin embargo, la estimulación a través del Fc $\gamma$ RI indujo la pérdida de esta asociación, ya que no se detectaron en los blots bandas indicativas de que Grb2 estuviera inmunoprecipitando con Syk en las células THP-1 estimuladas a través del Fc $\gamma$ RI (Fig 5.11 b). En células THP-1 estimuladas a través del Fc $\gamma$ RII no se observaron cambios en las células que no tuvieron VD3, pero en las células que sí estuvieron con tratamiento, la asociación de Grb2 con Syk fué disminuyendo, y este decremento fué significativo a las 48 horas de tratamiento, entre células estimuladas y no estimuladas (0.4 veces) (Fig 5.11 d).

En resumen, la diferenciación con VD3 de las células THP-1 no modificó el nivel de asociación de Grb2 con Syk, y hubo una ligera disminución en el nivel de asociación de Cbl con Syk. Tras la agregación del Fc $\gamma$ RI la asociación de Syk con Grb2 se pierde, y la asociación de Syk con Cbl tiene un ligero aumento en las células no diferenciadas, pero va disminuyendo hasta llegar como a sus niveles basales en las células diferenciadas con VD3. Esto indica que las diferencias observadas en la asociación de Syk con Grb2 y Cbl reflejan la formación de complejos diferentes tras la agregación del Fc $\gamma$ RI o Fc $\gamma$ RII ya que el nivel de expresión de Cbl y Grb2 no cambió.

**Estimulación a través del Fc $\gamma$ RI**  
**A Nivel de asociación de Cbl con Syk**



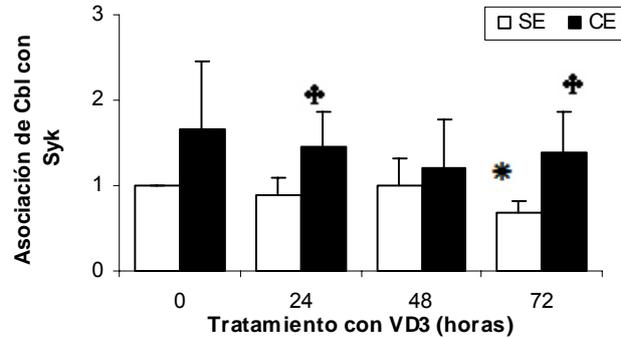
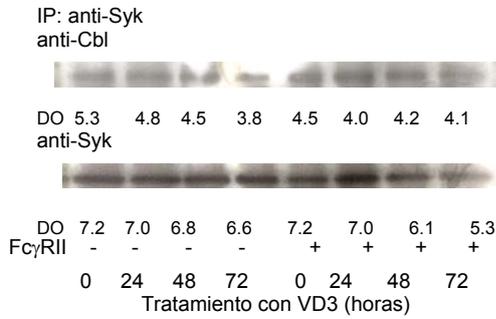
**B Nivel de asociación de Grb2 con Syk**



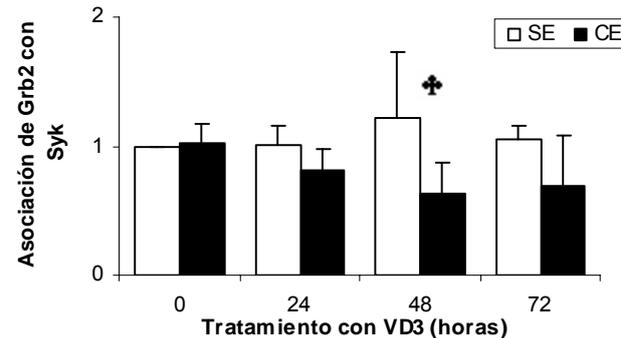
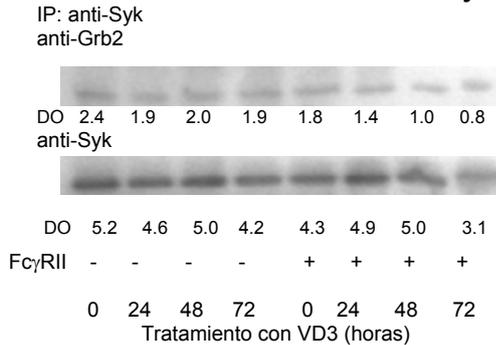
Continuación Fig 5.11

**Estimulación a través del Fc $\gamma$ RII**

**C Nivel de asociación de Cbl con Syk**



**D Nivel de asociación de Grb2 con Syk**



**Fig 5.11 Nivel de asociación de Cbl y Grb2 con Syk en células THP-1 durante el tratamiento con VD3 por 0, 24, 48 y 72 horas y estimuladas a través del Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII.** Células THP-1 sin tratamiento y tratadas con VD3 por 24, 48 y 72 horas se estimularon usando fragmentos F'(ab)<sub>2</sub> del anticuerpo anti-Fc $\gamma$ RI o anti-Fc $\gamma$ RII, y se agregaron los receptores usando fragmentos de anticuerpos F'(ab)<sub>2</sub> y se incubaron las células por 3 minutos. Se inmunoprecipitó Syk de los lisados celulares obtenidos, los inmunoprecipitados se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Por Western blot se determinó Syk, Cbl y Grb2 en los inmunoprecipitados. Se muestra un experimento representativo indicando el valor de la densidad óptica (D.O.) de cada una de las bandas, también se muestran los gráficos que corresponden al promedio  $\pm$  DS del nivel de asociación de Cbl (n=3) y Grb2 con Syk (n=3). \* Indica una diferencia significativa (p < 0.05) comparado con las células no estimuladas y sin tratamiento con VD3. ♣ Indica una diferencia significativa (p < 0.05) comparando células con y sin estímulo tratadas por el tiempo indicado.

### **5.8 Nivel de fosforilación de Syk y la asociación de SHP-1 en MHSP tratados con VD3**

Con el fin de determinar si los cambios observados en las células THP-1 tratadas con VD3 y estimuladas a través de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII se presentaban también en células monocíticas normales, se realizaron ensayos en MHSP. En la primera sección de resultados se mostró que el tratamiento con VD3 indujo cambios morfológicos y fenotípicos en los MHSP, sugerentes de que estaban pasando a un estadio más diferenciado. Se necesitan varios millones de MHSP para la determinación del nivel de expresión de SHP-1, Cbl, Grb2 y Syk, así como para la determinación del nivel de asociación de SHP-1, Cbl y Grb2 con Syk, en células no estimuladas y estimuladas a través de la agregación del Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII, a los diferentes tiempos de tratamiento. En la práctica resultó difícil obtener tal cantidad de monocitos del mismo donador, por lo que se ajustó la cantidad de células usadas en los ensayos, así como los tiempos en los que se realizaron las determinaciones, siendo los niveles de expresión y fosforilación basales los que se compararon en los MHSP tratados con VD3 a las 72 horas de tratamiento. Aún así, no se obtuvo una cantidad suficiente de MHSP para realizar el ensayo completo en todos los donadores (n=16). De los donadores donde sí se obtuvo una cantidad adecuada de MHSP, los resultados mostraron variaciones en el nivel de fosforilación y asociación por lo que no fue posible relacionarlas como en las células THP-1. Los resultados de 5 donadores se muestran en la tabla 5.1

Los valores indicados en la tabla corresponden a los niveles de fosforilación o asociación obtenidos al dividir el valor de la intensidad de la banda de la proteína en los MHSP al tiempo cero y sin estímulo entre el valor de la intensidad de la banda de los MHSP que estuvieron en cultivo, con o sin VD3, con o sin estímulo.

Como podemos ver hubo mucha variación (de 0 hasta 10 veces en magnitud) en los valores que se obtuvieron de fosforilación de Syk así como del nivel de asociación de SHP1 con Syk. En los donadores 1 y 4 se observa que la fosforilación de Syk disminuyó en las células que estuvieron en cultivo con VD3 respecto a las que permanecieron en cultivo sin la VD3; y que al ser estimuladas

por la agregación del Fc $\gamma$ RII, la fosforilación de Syk aumento en las células cultivadas sin VD3 y disminuyó en las células cultivadas con VD3. Estos cambios concuerdan con los observados en las células THP-1, aunque no se observa un claro aumento en el nivel de asociación de SHP-1 con Syk. Se observa que en los donadores 2 y 3 hay una disminución en el nivel de asociación de SHP-1 con Syk en las células que permanecieron en cultivo con o sin VD3. Para el donador 1 el nivel de asociación de Syk con SHP-1 aumentó en las células al tiempo cero y estimuladas con el Fc $\gamma$ RII, y en las células cultivadas con VD3 y no estimuladas. De esta manera, como podemos observar, las respuestas que presentó cada individuo son diferentes en todos los casos, no importando que la VD3 indujera una diferenciación en los MHSP. Esta diferenciación se corroboró al evaluar los niveles de expresión de CD14 y CR3 como marcadores de diferenciación y estos cambios no tuvieron desviaciones considerables. Esto se debe en parte, al diferente estado de activación basal que presenta la población de monocitos entre los distintos individuos, por lo que no hay reproducibilidad en los experimentos realizados, y es difícil observar cambios semejantes a los observados en células THP-1.

**Tabla 5.1** Se indican los valores correspondientes al nivel de fosforilación de Syk y nivel de asociación de SHP-1 con Syk.

Donador	Fosforilación de Syk						Asociación de SHP-1 con Syk											
	Basal			72 horas			72 horas/VD3			Basal			72 horas			72 horas/VD3		
	SE	Fc $\gamma$ RI	Fc $\gamma$ RII	SE	Fc $\gamma$ RI	Fc $\gamma$ RII	SE	Fc $\gamma$ RI	Fc $\gamma$ RII	SE	Fc $\gamma$ RI	Fc $\gamma$ RII	SE	Fc $\gamma$ RI	Fc $\gamma$ RII	SE	Fc $\gamma$ RI	Fc $\gamma$ RII
1	1	0.9	↑*1.6	↑*2.5	ND	♣↑*9.7	♣↓1.2	ND	♣↓1.2	1	↑*1.6	1.2	1.2	ND	1.4	↑*1.7	ND	1.4
2	1	↑*2.6	↑*3.3	↑*2.1	↑*3.1	↑*3.5	↑*2.6	♣↑*4.2	↑*3.5	1	↓*0.4	↓*0.6	↓*0.2	↓*0.3	↓*0.2	↓*0.3	↓*0.3	↓*0.3
3	1	1	0.7	↓*0.4	0.3	↓*0.4	♣↑1.1	↓*0.5	↓*0.3	1	0.7	0.7	↓*0.4	0.7	♣↓0.2	↓*0.6	1	♣↓*0.1
4	1	ND	1.2	0.7	ND	♣↑1.3	↓*0.4	ND	♣*0.6		ND			ND			ND	

Los MHSP aislados (basal), sin tratamiento y tratados con VD3 por 72 horas se estimularon usando fragmentos F'(ab)<sub>2</sub> del anticuerpo anti-Fc $\gamma$ RI o anti-Fc $\gamma$ RII y se agregaron los receptores usando fragmentos de anticuerpos F'(ab)<sub>2</sub> y se incubaron las células por 3 minutos. Se inmunoprecipitó Syk de los lisados celulares obtenidos, los inmunoprecipitados se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Por Western blot se determinó Syk, Cbl y Grb2 en los inmunoprecipitados. Se muestran los incrementos o decrementos en la fosforilación y asociación de Syk, los valores obtenidos corresponden al valor de densidad óptica de la banda de SHP-1 o de fosfotirosina entre el valor de densidad óptica de Syk, el valor obtenido se ajusto al valor basal obtenido. Las flechas indican que hay diferencias  $\geq 0.5$  unidades respecto al valor basal. ♣ Indican diferencias en los valores obtenidos entre las células tratadas con VD3 y las no tratadas con VD3. ND, no determinado. SE, células sin estímulo. Fc $\gamma$ R, células estimuladas tras la agregación del Fc $\gamma$ RI. Fc $\gamma$ RII, células estimuladas tras la agregación del Fc $\gamma$ RII (↑, ↓ aumento, disminución).

## Capítulo 6

### ***DISCUSIÓN***

La activación de los Fc $\gamma$ R por complejos inmunes activa múltiples caminos de señalización que conducen a la fagocitosis y otras respuestas. Es importante comprender los eventos de transducción de señales iniciados por la estimulación de los Fc $\gamma$ R, ya que a través de ellos se regulan varios procesos fisiológicos/patológicos en los que estos receptores participan, tanto en la fase inductora como en la fase efectora de la respuesta inmune como la inflamación, la autoinmunidad y leucemias.

Diversos autores coinciden en que el balance entre la actividad de los receptores activadores e inhibidores determina la magnitud de la respuesta celular (Zhang et al, 2000; Okazawa et al, 2005). Por una parte se sabe que el dominio citoplasmático de la cadena gamma asociada a los Fc $\gamma$ RI y IIIa, o la porción citoplasmática del Fc $\gamma$ RIIIa, son esenciales para las funciones de estos receptores activadores, como la fagocitosis y la internalización de complejos antígeno-anticuerpo (Monari et al, 2000; Hammerman 2006). Por otra parte, estas funciones son reguladas por la actividad inhibitoria del Fc $\gamma$ RIIb, el cual regula negativamente la actividad celular por ajuste del umbral en el que los complejos inmunes activan a las células (Wijngaarden, 2004).

Para que ambos receptores lleven a cabo su función en la transducción de señales, es necesaria la fosforilación de los motivos ITAM/ITIM, así como la activación de cinasas de residuos de tirosina de la familia Src y de la cinasa de tirosina Syk (Isnardi et al, 2001; Kant et al 2002; Huang et al, 2003). Además de la actividad de cinasas requerida para su fosforilación, el estado de fosforilación de los motivos es regulado por fosfatasas citoplasmáticas (Zhang et al, 2000; Berton et al, 2005, Okazawa et al, 2005).

Las fosfatasas de inositol (SHIP) y de tirosina (SHP) han sido implicadas en la atenuación de la respuesta mediada por el Fc $\gamma$ RIIb en células B y en macrófagos. SHP-1 inhibe la respuesta celular por desfosforilación de residuos de

tirosinas en proteínas entre las cuales se incluyen el ITAM del mismo receptor activador, cinasas de la familia Syk, PLC $\gamma$  y proteínas adaptadoras como SLP76 (Tamir et al, 2000). Datos previos de nuestro laboratorio mostraron que en células THP-1 la fosfatasa SHP-1 coimmunoprecipita con Syk y que el grado de coimmunoprecipitación es afectado por el estado de diferenciación de la célula y por el entrecruzamiento de los receptores Fc $\gamma$ RII (Agramonte, 2003). La participación de SHP-1 en la regulación de las funciones mediadas por Fc $\gamma$ R en macrófagos es muy importante; se ha observado que macrófagos de ratones deficientes en SHP-1 muestran respuestas aumentadas a diferentes estímulos, sugiriendo que en condiciones normales SHP-1 regula negativamente la activación de éstos (Zhang et al, 2000; Hardin et al, 2006).

El objetivo del proyecto era determinar si la diferenciación con VD3 de las células monocíticas THP-1 afectaba la señalización a través de los Fc $\gamma$ Rs debido a una modificación de la asociación de SHP-1 con Syk y/o con proteínas adaptadoras. En nuestro laboratorio se ha demostrado que el tratamiento con VD3 durante el cultivo induce diferenciación de líneas celulares monocíticas hacia un fenotipo macrófago (Martínez, 2002; Agramonte et al, 2003). La modulación en la diferenciación que VD3 induce en los monocitos se asemeja a la que sucede *in vivo*, cuando los MHSP de torrente sanguíneo arriban hacia el tejido, en donde finalmente se diferenciará a macrófago. Este modelo de diferenciación con VD3 fue el que se utilizó para poder cumplir con los objetivos del proyecto.

El tratamiento de las células THP-1 con VD3 indujo un aumento significativo en el nivel de expresión de CD14 y de CR3 (Fig 5.3 A y B), característicos del fenotipo macrófago, así como un aumento en la adherencia y tamaño celular, cambios sugerentes de que se está llevando a cabo un proceso de diferenciación. No se observaron cambios en el nivel de expresión de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII (Fig 5.3 C y D), lo cual corrobora resultados obtenidos en el laboratorio anteriormente y que indican que el nivel de respuesta tras la agregación de los receptores posiblemente no se debe a cambios en la expresión de receptores. En MHSP tratados con VD3 también se observó un aumento significativo en la expresión de CD14 (Fig 5.4 A). Los cambios morfológicos observados y el aumento en la expresión de CD14 indican que la VD3 indujo la diferenciación de

los MHSP. En los MHSP la expresión de CR3 disminuyó entre las 24 y 48 horas de tratamiento con VD3, pero a las 72 horas la expresión regresó a sus niveles basales (Fig 5.4B). No se observaron cambios en la expresión del Fc $\gamma$ RI, mientras que la expresión del Fc $\gamma$ RII aumentó en los MHSP a las 72 horas de tratamiento con VD3 (Fig 5.4 C y D).

Concluimos que la VD3 modula el nivel de expresión de CD14 y CR3 en las células THP-1, y en los MHSP principalmente en el nivel de expresión de CD14 y en menor grado del Fc $\gamma$ RII.

Las comparaciones en cuanto al nivel de fosforilación de Syk se realizaron en las condiciones de estimulación individual del Fc $\gamma$ RI o Fc $\gamma$ RII que lograban inducir el máximo de señal de fosforilación de Syk en las células THP-1 y en MHSP (Fig 5.5). Se usaron F(ab) $'_2$  con el objetivo de evitar algún tipo de señalización por fosforilación de Syk resultante de la unión de la porción Fc de los anticuerpos primarios y secundarios a los Fc $\gamma$ Rs.

Se determinaron cambios en la asociación de Syk y SHP-1 debido a la agregación de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII. Los resultados obtenidos muestran que la agregación del Fc $\gamma$ RI o Fc $\gamma$ RII inducen un aumento en el nivel de fosforilación de Syk, y este aumento fué mayor para el Fc $\gamma$ RI, y la asociación de Syk con SHP-1 no tuvo cambios significativos para ambos receptores (Fig 5.8 B y 5.9 B). Estos datos muestran que Syk es activada en diferente grado por los receptores Fc $\gamma$ RI o Fc $\gamma$ RII.

En células THP-1 diferenciadas con VD3 el nivel de asociación de Syk con SHP-1 y el nivel de fosforilación aumentaron de manera similar (Figs 5.8 B y D), indicando que la diferenciación de las células THP-1 con VD3 aumenta los niveles basales de fosforilación de Syk así como su asociación con SHP-1.

Cuando las células diferenciadas con VD3 fueron estimuladas a través de la agregación del Fc $\gamma$ RI la asociación de SHP-1 con Syk disminuyó hasta niveles basales y el nivel de fosforilación de Syk fué disminuyendo hasta tener el mismo nivel respecto a las células THP-1 diferenciadas (Figs 5.8 B y D). En el caso de las células diferenciadas con VD3 y estimuladas a través del Fc $\gamma$ RII el nivel de fosforilación de Syk fué disminuyendo hasta la mitad de su nivel basal (Fig 5.9 B). El nivel de asociación de SHP-1 con Syk aumentó de manera significativa tras la

estimulación a través del Fc $\gamma$ RII en células que habían sido tratadas con VD3 por 48 y 72 horas (Fig 5.9 D).

Se puede relacionar el aumento en el nivel de asociación de SHP-1 con Syk en las células estimuladas a través del Fc $\gamma$ RII, con la disminución en el nivel de fosforilación de Syk a las 72 horas con VD3, ya que SHP-1, la fosfatasa específica de fosfotirosina puede estar ejerciendo su actividad y causar la desfosforilación de Syk.

SHP-1 actúa en múltiples etapas durante la diferenciación de células hematopoyéticas para alterar el balance en la activación de las células (Paling, 2005). Durante el proceso de diferenciación de los monocitos hacia macrófagos, se han reportado cambios en el nivel de fosforilación de Syk, y que SHP-1 se asocia a Syk durante la agregación de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII, en líneas celulares monocíticas (Agramonte et al, 2003). Pero aún no está claro si se ven afectados los eventos bioquímicos iniciados por la agregación de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII durante el proceso de diferenciación. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que SHP-1 se activa tras la agregación del Fc $\gamma$ RII y que puede estar controlando la activación de la célula inducida por los receptores Fc $\gamma$ Rs a través de la desfosforilación de Syk, ya que se observa un aumento en la asociación cuando se agrega el Fc $\gamma$ RII. La fosfatasa SHP-1 se une a tirosinas fosforiladas a través de sus dominios SH2 (Zhang et al, 2000), tras la unión al ITIM del Fc $\gamma$ RIIb (Kwatkoska et al, 2000; Berton et al, 2005; Hammerman et al, 2006) o al ITAM del Fc $\gamma$ RIIa (Ganesan et al, 2003; Hammerman et al, 2006), presenta un cambio alósterico y se vuelve activa (Poole y Jones, 2005). SHP-1 se fosforila en las tirosinas 536 y 564 y su actividad se ve incrementada (Zhang et al, 2002).

En células THP-1 la diferenciación inducida por VD3 no modula los niveles de expresión de Syk y SHP-1 ya que no mostraron cambios significativos. De manera que los cambios observados en el nivel de fosforilación de Syk y a su asociación con SHP-1 no se debieron a un limitante debido a variaciones en la expresión de Syk o de SHP-1 (Fig 5.7 B), o a cambios en el nivel de expresión de los Fc $\gamma$ RI o Fc $\gamma$ RII.

La última parte de los objetivos correspondieron a la posible participación de las adaptadoras Cbl y Grb2 en la asociación de SHP-1 con Syk. Estas

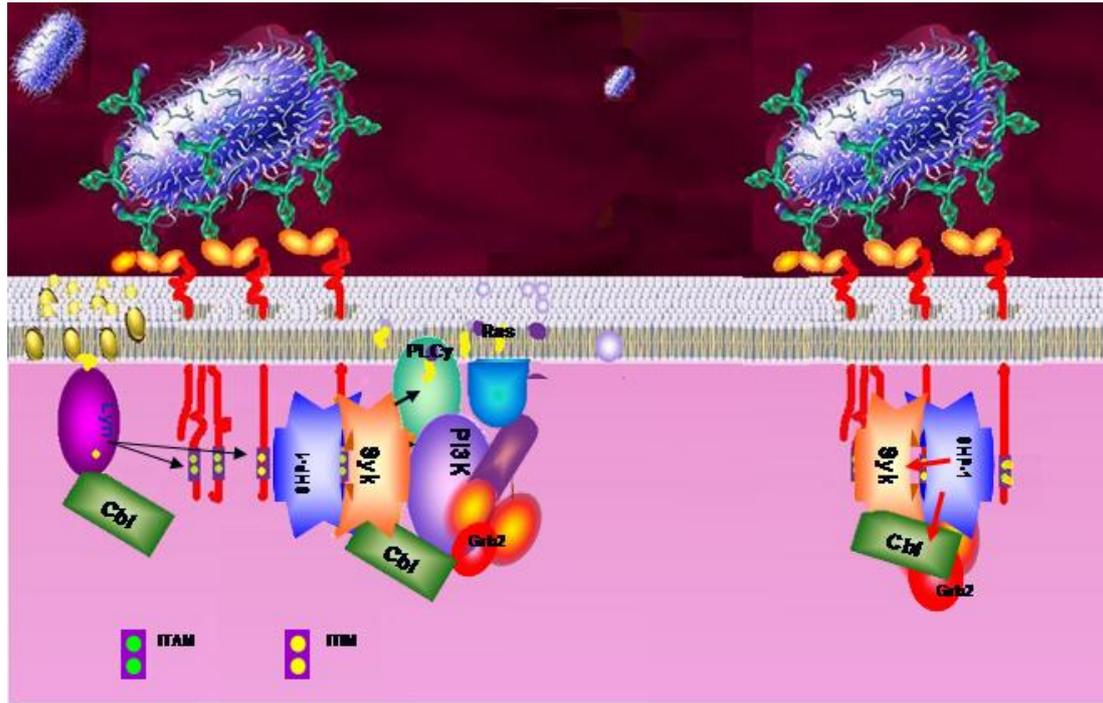
proteínas coimmunoprecipitan con Syk, lo cual sugiere que se pueden asociar a Syk o que se encuentran dentro de un complejo de proteínas que incluyen a Syk. El nivel de asociación de Cbl con Syk, en células THP-1 sin estimular va disminuyendo ligeramente, aunque es significativo a las 72 horas de tratamiento con VD3. Cuando las células son estimuladas a través del Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII hay un aumento inicial en la asociación y luego ésta disminuye en las células tratadas con VD3, aunque estos cambios no son significativos. Se ha reportado que Cbl forma complejos dependientes de estimulación, con Syk y ZAP70 en linfocitos T (Coopman, 2006). De esta forma Cbl actúa como ligasa de ubiquitina E3 donde sus blancos son receptores con actividad de cinasas de residuos de tirosina, como las cinasas de la familia Src. En células Jurkat (células T), c-Cbl interacciona con Lck y Fyn, cinasas de la familia Src. La fosforilación de c-Cbl por Lck parece requerirse para formar un complejo entre c-Cbl y el dominio SH2 en la subunidad p85 de PI3K, que al parecer es necesario para reclutar a PI3K en la membrana. Por otra parte Cbl-b también interacciona con la subunidad p85 de PI3K para regular negativamente la señalización por PI3K. Además c-Cbl interacciona con las proteínas adaptadoras SLAP y Grb2. La interacción entre c-Cbl y Grb2 se sugiere que es para inhibir la activación de la célula T (Loeser y Penninger, 2007) Algún tipo de interacción semejante podría estar ocurriendo en los monocitos, aunque en el presente trabajo sólo se reporta de manera general a Cbl y no a sus isoformas, aunque por los datos obtenidos suponemos que c-Cbl podría estar interaccionando con Grb2 cuando se activa el Fc $\gamma$ RII.

No se encontró Grb2 asociado a Syk después de que las células fueron estimuladas a través del Fc $\gamma$ RI. Al parecer cuando el Fc $\gamma$ RI es agregado la asociación de Syk y Grb2 se pierde. De manera general las bandas detectadas de Cbl y Grb2 en los inmunoprecipitados de Syk son tenues y muchas veces difíciles de detectar, lo cual probablemente se debe a que hay poca a cantidad de proteína que coimmunoprecita con Syk.

Se ha reportado que Cbl se puede unir a través de su región rica en prolinas al dominio SH3 de Grb2, siendo Grb2 la encargada de reclutar a Cbl tras la agregación del EGFR. También se ha reportado que Cbl a través de su dominio SH3 se puede unir al dominio SH2 de cinasas de la familia Src y Syk, y que

aumenta la actividad de Syk (Machida et al, 2004); aunque hay reportes contradictorios que indican que Cbl disminuye la señal de activación de Syk en plaquetas (Moon, 2005), o que tiene un papel regulatorio (Dangelmaier et al, 2005). También se sabe que SHP-1 puede desfosforilar a Cbl, de manera que no sólo regula el estado de fosforilación de Syk, sino que podría regular el de Cbl (Kant et al, 2002). SHP-1 es una fosfatasa específica de residuos de tirosina a la cual se le han propuesto otras funciones (Poole y Jones, 2005). Así por ejemplo, se ha propuesto que la región C-terminal de SHP-1, la cual contiene residuos de tirosina que pueden ser fosforilados, puede estar involucrada en la función como proteína adaptadora propuesta (Zhang et al, 2002), al reclutar a proteínas como Grb2 y SHIP, a través de sus dominios SH2 (Zhang et al, 2000; Poole y Jones, 2005). También se ha propuesto que la fosforilación de las tirosinas de la región C-terminal de SHP-1 pueden regular su actividad de fosfatasa (Minno et al, 2004).

Con los resultados obtenidos se puede proponer que: a) una vez que los receptores Fc $\gamma$ RI o II se han agregado, las cinasas de la familia Src fosforilan los residuos de tirosina de los motivos ITAM e ITIM de los receptores Fc $\gamma$ R. Cbl podría ser también fosforilado por las cinasas de la familia Src, y localizarse cerca del sitio de agregación de los receptores. b) Las tirosinas fosforiladas del ITAM son sitios de unión para el dominio SH2 de Syk. Cbl en su función de adaptadora puede asociarse con Syk para facilitar la formación del complejo de señalización. c) SHP-1 puede estar regulando la fosforilación de Syk, de otros ITAMs. Cuando el motivo ITIM es fosforilado, SHP-1 es reclutada y ejerce su actividad de fosfata sobre sus sustratos, probablemente se une a Grb2, la cual le puede estar ayudando como adaptadora dentro del complejo de señalización. En el laboratorio se ha observado que Grb2 no inmunoprecipita en péptidos de ITAM fosforilado (datos no publicados) lo cual concuerda con el hecho de que deja de verse la asociación de Syk con Grb2 tras la agregación del Fc $\gamma$ RI en las células THP-1. Estas observaciones apoyan la propuesta de que Grb2 puede estar unida dentro del complejo a SHP-1 activada y la puede estar ayudando al reclutar a otras proteínas para su desfosforilación (Fig 6.1)



**Fig 6.1 Complejos de señalización propuestos que se forman tras la agregación de los receptores Fc $\gamma$ Rs.**

Los receptores Fc $\gamma$ R reconocen complejos inmunes a través de la porción Fc de las IgGs, una vez que se han agregado estos receptores, cinasas de la familia Src como Lyn, Fyn y Hck localizadas en dominios de la membrana ricos en colesterol se activan y fosforilan las tirosinas presentes en los dominios ITAM e ITIM de los receptores Fc $\gamma$ R, así como a Cbl. En la señalización de activación la cinasa de tirosina Syk se une a las tirosinas fosforiladas del ITAM a través de su dominio SH2. Syk se activa y va a fosforilar a otras proteínas río abajo de la cascada de señalización, entre ellas se encuentran PLC $\gamma$  y PI3K. Cbl en su función de adaptadora puede asociarse con Syk y/o con la subunidad p85 de PI3K. En la señalización de inhibición, el ITIM del Fc $\gamma$ RIIb es sitio de unión de las fosfatas de tirosina SHP, SHP-1 y SHP-2, que van a ejercer su actividad de fosfatas en otras proteínas activadas por la señalización que se da a través de los ITAMs así como de fosfatos de inositol. SHP-1 desfosforila a Syk e incluso ITAMs fosforilados, evitando que se activen a otras proteínas río abajo de la señalización, y va a interactuar con Grb2, la cual podría reclutar a Cbl.

Los resultados obtenidos cumplen parcialmente los objetivos planteados en el proyecto original. La parte correspondiente a los MHSP fue difícil de cubrir, debido a que se requiere una gran cantidad de los mismos y no siempre se obtuvieron de los donadores. Los resultados obtenidos en las citometrías para evaluar la expresión de moléculas de membrana no son tan variables como los obtenidos para evaluar la asociación de proteínas. En los ensayos de estimulación no se pudo establecer una correlación entre el nivel de fosforilación de Syk y los niveles de asociación con SHP-1, Cbl y Grb2. Esto puede indicar que los monocitos obtenidos de los donadores, tienen un estadio distinto de

diferenciación/activación, y es este entorno intracelular el que está influyendo en la respuesta final, la cual fue diferente cuando se estimularon los MHSP de diversos donadores. En estas condiciones resulta difícil extrapolar los resultados del estado de activación de las células de la línea celular a los MHSP. Los estímulos externos, un ambiente inflamatorio o anti-inflamatorio al que esté expuesto cada donador pueden repercutir en la diferenciación/activación basal de los monocitos. Aún así estos datos nos dan un acercamiento de los complejos de señalización que se forman cuando los receptores  $Fc\gamma R$  se agregan en monocitos durante su diferenciación.

## **CONCLUSIONES**

La diferenciación de los monocitos THP-1 con VD3 no modula la expresión en membrana de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII; ni de las proteínas citosólicas Syk, SHP-1, Grb2 y Cbl. Pero sí se observa un aumento en el nivel de fosforilación basal de Syk así como la asociación de Syk con SHP-1.

En los monocitos THP-1 la fosforilación de Syk es mayor tras la agregación del Fc $\gamma$ RI que tras la agregación del Fc $\gamma$ RII y no hay cambios en la asociación de Syk con SHP-1. En cambio, en monocitos THP-1 diferenciados con VD3 cuando se agrega el Fc $\gamma$ RII disminuye la fosforilación de Syk y aumenta la asociación de SHP-1 con Syk, de manera que concluimos que SHP-1 puede estar regulando el estado de fosforilación de Syk tras la agregación de los Fc $\gamma$ Rs.

Cbl y Grb2 se encuentran constitutivamente asociadas a Syk con SHP-1 en los monocitos THP-1, en los monocitos diferenciados disminuye ligeramente la asociación de Cbl. Tras la agregación de los receptores no se observaron cambios en la asociación de Cbl con Syk y SHP-1, y Grb2 deja de asociarse con Syk y SHP-1 cuando se agrega el Fc $\gamma$ RI. Esto indica que la diferenciación de los monocitos THP-1 con VD3, sí modifica la señalización a través del Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII, debido a que se modifica la asociación de Syk con SHP-1, y de las adaptadoras Cbl y Grb2. Además SHP-1 regula la activación de Syk tras la agregación del Fc $\gamma$ RII en células THP-1 diferenciadas con VD3 y Grb2 forma parte del complejo inicial de señalización que se forma. Tras la agregación del Fc $\gamma$ RI, Grb2 no participa en el complejo inicial de señalización.

En monocitos humanos obtenidos de sangre periférica, la diferenciación con VD3 modula el nivel de expresión de CD14 y en menor manera del Fc $\gamma$ RII. No todos los monocitos obtenidos de los donadores se encuentran en un mismo estadio de diferenciación/activación y esto se ve reflejado en el diferente nivel de respuesta tras la agregación de los receptores Fc $\gamma$ R.

## **ABREVIATURAS**

<b>Ac</b>	anticuerpo
<b>ADCC</b>	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
<b>AP</b>	ácido fosfatídico
<b>Cbl</b>	proteína del linfoma de linaje B-casitas
<b>CCL</b>	quimiocina de la familia CC
<b>CCR, CxCR</b>	receptor de quimiocina de la familia CC y CXC respectivamente
<b>CD14</b>	receptor de lipopolisacarido
<b>CR3</b>	receptor tipo 3 para complemento
<b>DAG</b>	diacilglicerol
<b>Fc<math>\gamma</math>R</b>	receptor para la porción Fc de la inmunoglobulina G
<b>Grb2</b>	proteína 2 de unión al receptor de factor de crecimiento
<b>GM-CSF</b>	factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	interferón gamma
<b>IL</b>	interleucina
<b>IP3</b>	inositol trifosfato
<b>ITAM</b>	motivo de activación basado en tirosina de inmunoreceptores
<b>ITIM</b>	motivo de inhibición basado en tirosina de inmunoreceptores
<b>LPS</b>	lipopolisacarido
<b>M-CSF</b>	factor estimulador de colonias de macrófagos
<b>MHC II</b>	complejo principal de histocompatibilidad de antígenos de clase II
<b>MHSP</b>	monocitos humanos de sangre periférica
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	factor nuclear $\kappa$ B
<b>PI3K</b>	cinasa de fosfatos de inositol
<b>PGE2</b>	prostaglandina E2
<b>PKC</b>	proteína cinasa C
<b>PLC<math>\gamma</math></b>	fosfolipasa C
<b>RTK</b>	receptor con actividad de cinasa de tirosina
<b>SHP-1</b>	proteína fosfatasa con dominios SH2
<b>SNC</b>	sistema nervioso central
<b>Syk</b>	cinasa de residuos de tirosina de bazo
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	factor de crecimiento transformante beta
<b>TLR</b>	proteína receptora tipo Toll
<b>TNF</b>	factor de necrosis tumoral
<b>PGE2</b>	prostaglandina E2
<b>PTK</b>	proteína cinasa de tirosina
<b>VD3</b>	1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-vitamina D3

## Referencias

1. **Agramonte H J, Hallal C C, Garay C C, Guerra A C, Camacho A I, Ortega E.**  $1\alpha,25$ -dihidroxy-vitaminD3 alters Syk activation through Fc $\gamma$ RII in monocytic THP-1 cells. *Cell Biochem*, **2003**:89:1056-1076.
2. **Ancuta P.** Fractaline preferentially mediates arrest and migration of CD16 monocytes. *J Exp Med*, **2003**:197:1701-1707.
3. **Auwerx J.** The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, **1991**,15:22-31
4. **Berton G, Mócsai A, Lowell C A.** Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation. *Trends in Immunology*, **2005**:26:208-214.
5. **Boonstra A, Barrat F J, Crain Ch, Heath V L, Savelkoul H F, O'Garra A.**  $1\alpha,25$ -dihydroxvitamin D3 has a direct effect on naive CD4+T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol*, **2001**:167:4974-80.
6. **Boltz N G, Willheim M, Spittler A, Leutmezer F, Temfer C, Winkler S.** Modulation of IgG, IgE and IgG Fc receptor expression on human mononuclear phagocytes by  $1-\alpha,25$ -dihydroxvitamin D3 and citokines. *J Leukoc Biol*, **1995**:58:256-262
7. **Coggeshal K M, Nakamura K, Phee H.** How do inhibitory phosphatase work? *Mol Immunol*, **2002**:39:521-529.
8. **Coopman P J, Mueller S C.** The Syk tyrosine kinase: A new negative regulator in tumor growth and progression. *Cancer Lett*, **2006**:241:159-173.
9. **Cox D, Greenberg S.** Phagocytic signaling strategies: Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis as a model system. *Immunology*, **2001**:13:339-345.
10. **Daëron M.** Fc receptor biology. *Annu Rev Immuno*, **1997**:15:203-234.
11. **Dangelmaier C A, Quinter P G, Jin J, Tsyganskov A Y, Kunapuli S P, Daniel J L.** Rapid ubiquitination of Syk following GPVI activation in plaqueteles. *Blood*, **2005** :105:3918-3924.
12. **Feng G S, Hui C C, Pawson.** SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. *Science*, **1993**:259:1607-1611.
13. **Ganesan L P, Fang H, Marsh C B, Tridandapani S.** The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the phpsphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motiv of Fc $\gamma$ RIIa to modulate signaling events in myeloid cells. *J of Biol Chem*, **2003**:278:37:35710-717.
14. **Ganesan L P, Joshi T, Fang H, Kutala V K, Roda J, Trotta R, Lehman A, Kuppusamy P, Byrd J C, Carson W E, Caligiuri M A, Tridandanpani S.** Fc $\gamma$ R induced production of superoxide and inflamatory citokines is diferentially regulated by SHIP through its influence on PI3K and or Ras/Erk patwhays. *Blood*, **2006**:09:3889.
15. **Grage-Griebenow E, Flad H D, Ernst M.** Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol*, **2001**:69 11-20.
16. **Goerdts S, Politz O, Schledzewski K, Birk R, Gratchev A, Guillot P, Haiky N, Klemke CD, Dippel E, Kodelja V, Orfanos C E.** Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology*, **1999**:67:222-226.
17. **Gordon S.** Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, **2003**:3:23-34.
18. **Gordon S, Taylor P R.** Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, **2005**:5: 953-964.
19. **Greenberg S, Grinstein S.** Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opinion in immunology* **2002**:14:136-145
20. **Groesh T D, Zhou F, Mattila S, Geahlen R L, Post C B.** Structural basis for the requirement of two phosphotyrosine residues in signaling mediated by Syk tyrosine kinase. *J Mol Biol*, **2006**:356:1222-1236.
21. **Gurlek A, Pittelkow M R, R Kumar.** Modulation of growth factor/citokine synthesis and signalling by  $1\alpha,25$ -dyhidroxivitamin D3: implications in cell growth and diferentiation. *Endocrine reviews*, **2002**:23:763:786.
22. **Hamerman J A, Lanier L L.** Inhibition of immune reponses by ITAM-bearing receptors. *Science's Stke*, **2006**:320.

23. **Hardin A M, Meals E A, Yi T, Knapp K M, English B K.** SHP-1 inhibits LPS-mediated TNF and iNOS production in murine macrophages. *Biochem and Bio Res*, **2006**:342: 547-555.
24. **Hodgson S, Dunn R.** Bone Marrow. *Encyclopedia of life sciences* **2001**:1-10.
25. **Hogarth P M.** Fc receptors are major mediators of antibody based inflammation in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. **2002**:6:798-802. Review.
26. **Horne W C, Sanjay A, Bruzzaniti A, Baron R.** The role (s) of Src kinase and Cbl proteins in the regulation of osteoclast differentiation and function. *Immunol Rev*, **2005**:208:106-125.
27. **Huang Z Y, Hunter S, Kim M K, Chien P, Worth R Q, Indik Z K, Schreiber A D.** The monocyte Fc $\gamma$  receptors Fc $\gamma$ RI/ $\gamma$  and Fc $\gamma$ RIIA differ in their interaction with Src-related tyrosine kinases. *J Leukoc Biol*, **2004**:76:491-494.
28. **Huang Z Y, Hunter S, Kim M K, Indik Z K, Schreiber A D.** The effect of phosphatases SHP-1 and SHIP-1 on signaling by the ITIM and ITAM-containing Fc $\gamma$  receptors Fc $\gamma$ RIIB and Fc $\gamma$ RIIA. *J Leukoc Biol*, **2003**:73:823-829.
29. **Imhof B A, Dunon D.** Leukocyte migration and adhesion. *Adv Immunol*, **1995**:58:345-416.
30. **Imhof B A, Lions-Aurand M.** Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol*, **2004**:4:432-444.
31. **Indik Z, Kelly C, Chien P, Levinson A, Schreiber A.** Induction of phagocytosis by a protein tyrosine kinase. 1995, *Blood*, 85:1175-1180.
32. **Isnardi I, Bruhns P, Bismuth G, Fridman W H, Däeron M.** The SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase SHIP1 is recruited to the intracytoplasmic domain of human Fc $\gamma$ RIIb and is mandatory for negative regulation of B cell activation. *Immunol Letters*, **2006**:104:156-165.
33. **Joshi T, Ganesan L P, Cao X, Tridandapani S.** Molecular analysis of expression and function of hFc $\gamma$ RIIb1 and b2 isoforms in myeloid cells. *Mol Immunol*, **2006**:43:839-850.
34. **Kant A M, De Pradip, Peng X, Yi Taolin, Rawlings J D, Kim S J, Durden L D.** SHP-1 regulates Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis and the activation of RAC. *Blood*, **2002**:100:1852-1859.
35. **Kiliszek A S, Kwiatkowska K, Sobota A.** Lyn and Syk kinases are sequentially engaged in phagocytosis mediated by Fc $\gamma$ R. *J Immunol*, **2002**:169:6787-6794.
36. **Kwiatkowska K, Frey J, Sobota A.** Phosphorylation of Fc $\gamma$ RIIA is required for the receptor-induced actin rearrangement and capping: the role of membrane rafts. *Journal of Cell Science*, **2002**:537-550.
37. **Lamoureux J L, Bradley D S.** Inflammatory mediators. *Encyclopedia of life sciences* **2007**.
38. **Larsen EC, DiGennaro JA, Saito N, Mehta S, Loegering DJ, Mazurkiewicz JE, Lennartz MR.** Differential requirement for classic and novel PKC isoforms in respiratory burst and phagocytosis in RAW 264.7 cells. *J Immunol*, 2000, Sep 1;165(5):2809-17.
39. **Leo A, Schraven B.** Adapters in lymphocyte signalling. *Current Opinion in Immunology*, **2001**:13: 307-316.
40. **Loeser S, Penninger J M.** Regulation of peripheral T cell tolerance by the E3 ubiquitin ligase Cbl-b. **2007**, *Seminars in Immunology* 19:206-214.
41. **Machida K, Mayer B J.** The SH2 domain: versatile signaling module and pharmaceutical target. *Biochem Biophys Acta*, **2004**:1747:1-25.
42. **Mantovani A, Sica A, Locati M.** New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol*, **2007**:37:14-16.
43. **Martínez L B.** Caracterización de cambios fenotípicos y funcionales en células de linaje mielomonocítico en diferentes estadios de diferenciación. *Tesis de licenciatura, Facultad de Química UNAM*, **2002**.
44. **Minno P, et al.** A novel SHP-1/Grb2 dependent mechanism of negative regulation of cytokine-receptor signaling: contribution of SHP-1 C-terminal tyrosines in cytokine signaling. *Blood* **2004**:103:1398-1407.
45. **Medzhitov R y Janeway C Jr.** Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **2000**, *Immunol Rev*, 173:89-97.
46. **Mesesson Y, Shtiegman K, Katz M, Zwang Y, Gyorgi V, Szollosi, Yarden Y.** Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. *Jour Biol Chem*, **2003**:278:21323-21326.

47. **Momose H, H Kurosu, N Tsujimoto.** Dual phosphorylation of phosphoinositide 3-kinase adaptor Grb2-associated binder 2 is responsible for superoxide formation synergistically stimulated by Fc $\gamma$  and formyl-methinyl-leucyl-phenylalanine receptors in differentiated THP-1 cells. *J Immunol*, **2003**:171:4227-4234.
48. **Monari C, Kozel T R, Paganelli F, Pericolini E, Perito S, Bistoni F, Casadevall A, Vecchiarelli.** Microbial immune Supresión mediated by direct engagement of inhibitory Fc receptor. *J Immunol*, **2006**:177:6842-6851.
49. **Monkawa T, Yoshida T, Hayashi M, Saruta T.** Identification of 25-dihydroxvitamin D3 1- $\alpha$ -hydroxylase gene expression in macrophages. *Kidney international*, **2000**:58:559-568.
50. **Moon K D, Post C B, Durdent D L, Zhou Q, Harrison M L, Geahlen R L.** Molecular basis for a direct interaction between the Syk protein-tyrosine kinase and Phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*, **2005**:280:1543-1551.
51. **Nimmerjahn F, Ravetch J V.** Fc $\gamma$  receptors: old friends and new family members. *Immunity*, **2006**:25:19-28.
52. **Nöel W, Raes G, Ghassabeh G H, De Baetselier P, Beschin A.** Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends in Parasitology*, **2004**:20:3:126:133.
53. **Okazawa H, Motegi S, Ohyama N, Ohnishi, Tomizawa T, Kaneko Y, Oldenberg P, Ishikawa O, Matozaki T.** Negative regulation of phagocytosis in macrophages by the CD47-SHPS-1 system. *J Immunol*, **2005**:174:2001-2011.
54. **Paling N R, Welham M J.** Tyrosine phosphatase SHP-1 acts at different stages of development to regulate hematopoiesis. *Blood*, **2005**:105:4290-4297.
55. **Pengal A R, Ganesan L P, Fang H, Marsh C B, Anderson C L, Tridandapani S.** SHIP-2 inositol phosphatase is inducibly expressed in human monocytes and serves to regulate Fc $\gamma$  receptor-mediated signaling. *J Biol. Biochem*, **2003**:278:22657-226663.
56. **Poole A W, Jones M L.** A SHPing tale: Prespectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phsphatases by the C-terminal tail. *Cellular Signaling*, **2005**:17:1323-1332.
57. **Rao N, Dodge I, Band H.** The Cbl family of ubiquitin ligases: critical negative regulators of tyrosine kinase signaling in the immune system. *J. Leukoc. Biol*, **2002**:71:753-763.
58. **Ravetch J V, Bolland S.** IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol*, **2001**:19:275-290.
59. **Rogler G, Hausmann D, Vogl E.** Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clin Exp Immunol*, **1998**:112:205-215.
60. **Shafer L, Gerwirth T.** Structural analysis of RXR-VDR interactions on DR3 DNA. *L Steroid Biochem & Mol Bio*, **2004**:89-90:215-219.
61. **Schelessinger J, Lemmon A.** SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sciences Stke*, **2003**:191:1-12.
62. **Swanson J A, Hoop A D.** The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol*, **2004**:76:1093-1103.
63. **Schmidt MHH, Dikic I.** The Cbl interactome ans its functions. *Nature*, **2005**:6:907-918.
64. **Sweeney M S, Wavreille A S, Park J, Butchar J P, Tridandapani S, Pei D.** Decoding Protein-Protein interactions through combinatorial chemistry: secuencia specific of SHP-1, SHP-2 and SHIP SH2 domains. *Biochemistry*, **2005**:44:45:14932-14947.
65. **Thomas L M.** Positive and negative regulation of leucocyte activation by protein tyrosine phosphatases. *Immunology seminars*, **1995**: 7:279-288.
66. **Tridandapani S, Siejker K, Teillaud J L, Carter J E, Wewers M D, Anderson C L.** Regulated expression and inhibitory function of Fc $\gamma$ RIIb in human monocityc cells. *J Biochem Chem*, **2002**: 277:5082-5089.
67. **Trinchieri G, Rosen M, Perussia B.** Induction of Differentiation of Human Myeloid Cells Lines by Tumor Necrosis Factor in Cooperation with 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D $_3$ . *Cancer Research*, **1987**:47:2236-2242.
68. **Tokuda N, Levy R B.** 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates phagocytosis but suppresses HLA-DR and CD13 antigen expression in human mononuclear phagocytes. *Prop Soc Exp Biol*, **1996**: 84:200-206.
69. **Turner M, Schweighoffer C F, Di Santo A, Tybulewicz V.** Tyrosine kinase Syk: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunology today*, **2000**.
70. **Turpin A J, Lopez G.** Differentiation, maduration and activation of monocytes and macrophages: functional activity controlled by a continuum of maduration. Mononuclear phagocytes in Cell Biology Ed. CRC Press, Inc **1993**:71-99.

71. **Shaffer L, Gerwirth T.** Structural analysis of RXR-VDR interactions on DR3 DNA. *J Steroid Biochem & Mol Biol* **2004**;89:90:215-219.
72. **Van Vugt J, Van de Winkel J.** Fc receptors. *Encyclopedia of life sciences*, **2002**.
73. **Vieira O V, Botelho R J, Brachmann R , Matsuo M, Davidson T, Schreiber W, Backer M, Cantley C, Grinstein S.** Distinct roles of class III phosphatidylinositol-3 kinase in phagosome formation and maturation. *J Cell Biol*, **2001**:155:19-25.
74. **Vieira O V, Botelho R J, Grinstein S.** Phagosome maturation: aging gracefully. *J Biochem*, **2002**:366:689-704.
75. **Wijngaarden S, van de Winkel G J, Jacobs K M, Bijlma J W, Lafeber F P, van Roon J A.** A shift in the balance of inhibitory and activating Fc $\gamma$  receptors on monocytes toward the inhibitory Fc $\gamma$  receptor IIb is associated with prevention of monocyte activation in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **2004**:50:3878-3887.
76. **Zhang J, Somani A K, Siminovitch A K.** Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling. *Immunology*, **2000**:12:361-378.
77. **Zhang Z, Shen K, Lu W, Cole PA.** The role of C-terminal tyrosine phosphorylation in the regulation of SHP-1 explored via expressed protein ligation. *J Biol Chem*, **2003**:278:4668-74.
78. **Zhao J, Lurie D L.** Loss of SHP-1 phosphatase alters cytokine expression in the mouse hindbrain following cochlear ablation. *Cytokine*, **2004**:7:28:1-9.
79. **Ziegler H W, Ulevitch R J.** CD14 cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* **1993**:10:510-516.