



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**“LA SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE LOS RECEPTORES
FcγRI Y FcγRII EN CÉLULAS MONOCÍTICAS ES
DETERMINADA POR EL ESTADO DE DIFERENCIACIÓN
CELULAR”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

Q.F.B. CLAUDIA HALLAL CALLEROS

Tutor: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO



MÉXICO, D. F. Marzo 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este Trabajo se desarrolló en el Laboratorio del Dr. Enrique Ortega, Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Para su realización se contó con donativos otorgados por el CONACYT (proyecto 45092) y DGAPA-PAPIIT (IN220705 e IN237204). Durante los estudios, Claudia Hallal recibió beca del CONACyT (92009) y apoyo complementario de DGAPA.

Agradecemos a la M. en I.B.B. Claudia Angélica Garay Canales su invaluable apoyo técnico.

COMITÉ TUTORAL

Dr. Enrique Ortega Soto
Dr. Carlos Rosales ledezma
Dra. Martha Robles

JURADO

Presidente: Dr. Carlos Rosalez Ledezma
Secretario: Dr. Enrique Ortega Soto
Vocal: Dra. Gloria Soldevila Melgarejo
Vocal: Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo
Vocal: Dra. Isabel Soto Cruz
Suplente: Dra. Martha Robles Flores
Vocal: Dra. Gohar Gevorgyan Markosian

DEDICATORIA

- ❖ A Dios, por dejarme ser.
- ❖ A mis padres, por su amor y su apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida, con mi más profundo amor y agradecimiento.
- ❖ A Casandra, mi motivo y mi motor hoy y siempre, mi más grande amor. A su papi por darle felicidad y amor, y por todo lo demás.
- ❖ A mi familia adorada, l@s hermanit@s más extrañados y los peques que endulzan las vacaciones.
- ❖ A mis amigos y amigas de Biomédicas, porque siguen siendo los de hoy y serán los de siempre.
- ❖ A los profes y a mi comité tutorial que aportaron su mejor esfuerzo tratando de formar a una Doctora, en especial a Enrique Ortega, mi guía y mi amigo.
- ❖ A mis amigos y amigas de mi tierra, por los bellos recuerdos y los momentos que aún podemos compartir.
- ❖ Al Profe Juan y al Profe Beni, con cariño entrañable, a la UAS y a todos los profes a los que no les pude agradecer en otra tesis.
- ❖ A l@s de Cuerna que saben que los quiero.
- ❖ A mi presente, por que se consolide... mucho y mucho y más.

INDICE:

	Página
RESUMEN	6
I.- INTRODUCCIÓN	7
I.1 Activación de leucocitos a través de receptores para inmunoglobulinas	8
I.2 Receptores para la porción Fc de la inmunoglobulina G (Fc γ Rs)	8
I.3 Receptores Multicadena de Reconocimiento Inmune (MIRRs)	15
I.3.1 Semejanzas estructurales y funcionales de los MIRRs.....	16
I.3.2 Transducción de señales por MIRRs. Papel de las cinasas Src y Syk.....	19
I.3.3 Regulación negativa de la señalización por MIRRs.....	19
I.4 El sistema fagocítico mononuclear	20
I.4.1 Funciones efectoras de los fagocitos mononucleares	22
I.4.2 Transducción de señales y diferenciación de células monocíticas	24
I.5 Planteamiento del Problema	26
II.- HIPOTESIS	27
III.- OBJETIVOS	28
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	28
IV.1 Modelo experimental	29
IV.2 Anticuerpos monoclonales anti-Fc γ	31
IV.3 Inducción de diferenciación	32
IV.4 Inmunofluorescencia indirecta	33
IV.5 Actividad enzimática	35
IV.6 Fagocitosis	35
IV.7 Estimulación celular	36
IV.8 Inmunoprecipitación e Inmunoblot	37
V.- RESULTADOS	38
V.1.- Estandarización de las condiciones para el análisis de la fosforilación en tirosina.....	38
V.2.- Inducción de diferenciación de células monocíticas U-937 y THP-1.....	47
V.2.1 Cambios en la morfología celular inducidos por los agentes inductores de diferenciación, en células monocíticas U-937 y THP-1.....	48
V.2.2 Cambios en la proliferación celular causados por los agentes inductores de diferenciación en células monocíticas U-937.....	55

V.2.3 Cambios en el contenido de enzimas hidrolíticas causados por los agentes inductores de diferenciación en células monocíticas.....	56
V.2.4 Cambios en la capacidad fagocítica de células monocíticas causados por los agentes inductores de diferenciación.....	57
V.2.5 La Vitamina D3 induce diferenciación de células U-937 caracterizada por un aumento de 10 veces en la fagocitosis mediada por los Fc γ Rs, sin un aumento significativo en la expresión de los Fc γ Rs.....	59
V.3. Activación de las cinasas de tirosina Syk y Lyn inducida por Fc γ Rs en células	64
V.3.1 La diferenciación inducida por VD3 aumenta la activación de Syk mediada por Fc γ RI y Fc γ RII.....	64
V.3.2 Efecto de la VD3 sobre la expresión de las cinasas Syk y Lyn.....	68
V.3.3 La fosforilación de Lyn inducida por el entrecruzamiento de los Fc γ RI y Fc γ RII aumenta significativamente después del tratamiento con Vitamina D3.....	69
VI.- DISCUSIÓN	72
VII.- CONCLUSIONES	78
VIII.- BIBLIOGRAFÍA	79

IX.- ANEXO

Claudia Hallal-Calleros, et. al Syk and Lyn phosphorylation induced by Fc γ RI and F γ RII crosslinking is determined by the differentiation state of U-937 monocytic cells. Immunology Letters 99 (2005) 169–179

RESUMEN

La fagocitosis mediada por receptores para la porción Fc de la IgG (Fc γ Rs) es una función esencial en los mecanismos de defensa del huésped. Este proceso es iniciado por el entrecruzamiento de los Fc γ Rs, lo que induce la fosforilación y activación de cinasas de tirosina de la familia Src y Syk, cuya activación es esencial para la fagocitosis y otras funciones efectoras iniciadas por los Fc γ Rs. La capacidad fagocítica de los fagocitos mononucleares, así como su capacidad para realizar otras funciones efectoras, cambia de acuerdo con el estado de diferenciación/maduración de la célula, el cual depende de factores del microambiente. El objetivo principal de esta tesis fue estudiar el efecto que el estado de diferenciación de la célula monocítica tiene sobre las vías bioquímicas de activación iniciadas a través de los receptores Fc γ Rs. Para abordar experimentalmente este estudio, primero establecimos un modelo *in vitro* de diferenciación que nos permitiera contar con poblaciones homogéneas de células monocíticas en diferentes estados de diferenciación. Se determinaron los cambios en la morfología, proliferación, expresión de marcadores en membrana, expresión de enzimas lisosomales, y capacidad fagocítica de las células monocíticas de las líneas U-937 y THP-1, inducidos por distintos agentes que han sido reportados como inductores de diferenciación *in vitro*: interferón- γ , ácido retinoico, forbol miristato acetato, y el metabolito activo de la Vitamina D3 (VD3). Cada uno de los agentes produjo un patrón de cambios fenotípicos distinto en las células monocíticas. En particular, la diferenciación de las células de la línea U937 inducida con VD3, provoca un aumento de 10 veces en la capacidad fagocítica en comparación con las mismas células sin tratamiento. Este cambio en capacidad fagocítica no se acompaña de un incremento en el nivel de expresión de los Fc γ Rs. Por estas razones, elegimos este sistema para analizar cuantitativamente la fosforilación y activación de las cinasas Lyn y Syk inducida por la agregación de los receptores Fc γ RI y Fc γ RII en células antes y después de la diferenciación. Los resultados mostraron que la fosforilación de Lyn y Syk inducida por la agregación del Fc γ RI o del Fc γ RII es mayor en células diferenciadas con VD3. Estos resultados sugieren que la señalización inducida por los Fc γ Rs en células monocíticas no depende solamente de la cantidad de receptores agregados, sino que depende también del estado de diferenciación de la célula.

I.- INTRODUCCIÓN

La señalización mediada por receptores induce cambios dentro de las células del sistema inmune que dan lugar a respuestas celulares entre las cuales se encuentran la quimiotaxis, la secreción de moléculas efectoras (proteasas, moléculas con actividad citotóxica, anticuerpos, etc), la proliferación celular, la diferenciación, y la secreción de citocinas que regulan la actividad de la misma célula o de otras.

La fosforilación de proteínas es una forma de regulación de la actividad enzimática, y de la capacidad de unión de las proteínas a otras moléculas. Las modificaciones en el estado de fosforilación de proteínas se llevan a cabo por cinasas y fosfatasa especializadas. El avance de la biología molecular ha facilitado la identificación de los genes de cientos de cinasas y fosfatasa con actividad reguladora, mientras que las técnicas bioquímicas y celulares han permitido la identificación detallada de complejas vías de regulación en las células. Tomando en cuenta la gran cantidad de procesos celulares que son controlados por la fosforilación de proteínas, el estudio de los mecanismos que regulan estos procesos es un área de investigación muy importante.

En este trabajo, se analizó la influencia del estado de diferenciación de la célula monocítica sobre la regulación de las señales de activación mediadas por receptores para la fracción Fc de los anticuerpos de la clase IgG (Fc γ Rs). En este modelo, la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina es un evento central para disparar la cascada de señalización que resulta en la activación de diversas funciones efectoras como fagocitosis, estallido respiratorio, síntesis y secreción de citocinas, etc. Si bien las moléculas principales que participan en el inicio de la señalización han sido identificadas, quedan todavía muchas preguntas sin resolver relacionadas con la regulación de la vía por factores independientes de la agregación de los receptores FcRs, como pueden ser: el estado funcional de la célula (estado de diferenciación/maduración), la estimulación simultánea a través de otros receptores, entre otros.

En los siguientes párrafos presentaré una descripción del modelo actual de la señalización mediada por receptores para inmunoglobulinas, con especial énfasis en las fases tempranas de la activación y en la participación de las cinasas de la familia Src y Syk. Después, abordo aspectos relacionados con las células del sistema de fagocitos mononucleares, y en especial con los procesos de diferenciación/activación de estas células, que dan como resultado una amplia heterogeneidad de sus estados funcionales. Los

antecedentes presentados son la base para plantear la justificación, la hipótesis y los objetivos de este trabajo.

I.1.- Activación de leucocitos a través de receptores para inmunoglobulinas (FcRs)

Las inmunoglobulinas juegan un papel muy importante en los mecanismos de defensa del organismo. Son producidos por linfocitos B, que además pueden expresarlos en su membrana en donde la función es actuar como receptores para antígeno, o bien secretarlos en forma soluble, encontrándose en el plasma y en las secreciones, cumpliendo su papel biológico en la eliminación de microorganismos o partículas extrañas. La interacción de las inmunoglobulinas con células efectoras se lleva a cabo a través de receptores presentes en su membrana, que son específicos para el segmento Fc (receptores para Fc ó FcRs). La agregación de FcRs promovida por complejos antígeno-anticuerpo puede desencadenar, dependiendo del tipo celular, una gran variedad de respuestas entre las que se incluyen: secreción de citocinas, fagocitosis, liberación de compuestos citotóxicos y de mediadores de la inflamación, estallido respiratorio, entre otros.

Se han descrito receptores Fc específicos para cada una de las distintas clases de inmunoglobulinas (Fc α R, Fc δ R, Fc ϵ R, Fc γ R y Fc μ R). Los receptores Fc son glicoproteínas que se expresan en la membrana de una amplia variedad de células hematopoyéticas, como monocitos, macrófagos, linfocitos, células asesinas naturales (NK), mastocitos, eosinófilos, basófilos y plaquetas, así como en ciertas células epiteliales (placenta, hígado e intestino neonatal).

I.2. Receptores para la porción Fc de la inmunoglobulina G (Fc γ R)

Los receptores para Fc de la inmunoglobulina G (Fc γ R) son una familia de receptores de membrana expresados sobre la mayoría de las células hematopoyéticas. Estos receptores participan de manera importante tanto en la fase aferente como en la fase efectora de la respuesta inmune adaptativa. En la fase aferente, participan regulando la activación de linfocitos B a través de su receptor para antígeno (BCR). Su participación en la fase efectora es más conocida, sirviendo de puente entre la inmunidad innata y la adaptativa, enlazando el reconocimiento del antígeno por los anticuerpos con la activación de funciones efectoras de las células.

Actualmente se conocen cuatro tipos de receptores para IgG: Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII y Fc γ RIV. Esta clasificación se basa en diversos criterios como peso molecular, afinidad y especificidad por distintas subclases de IgG, diferencias antigénicas reveladas por anticuerpos monoclonales y estructura génica. Los receptores Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII se identificaron hace más de 25 años, y se han caracterizado estructural y funcionalmente con mayor detalle. El receptor Fc γ RIV fue identificado recientemente (Mechetina et al, 2002; Davis et al, 2002; Nimmerjahn et al, 2005) en células de ratón, y su caracterización funcional es aún incompleta.

Los receptores Fc γ RI, II y III humanos son codificados por al menos ocho genes individuales, todos situados en el cromosoma 1, y la diversidad de sus productos aumenta por procesamientos alternativos de los ARN mensajeros. Los tres tipos de receptores presentan una alta homología en sus porciones extracelulares (70-95%) y en la porción transmembranal en receptores del mismo grupo (50-76%), pero baja cuando se comparan distintos grupos. Las porciones citoplasmáticas presentan un 16% de homología entre receptores de un mismo grupo y no hay homología entre receptores de grupos diferentes (Kinet, J.P. 1989). El gene para el Fc γ RIV murino también se localiza en el cromosoma 1 junto a los genes para los otros receptores Fc γ Rs, y en el humano, el gen Fc γ RIIIa es el ortólogo del gen Fc γ RIV murino. Exceptuando a los receptores del grupo II, los Fc γ Rs se expresan en las membranas asociados a otras moléculas que participan en la señalización.

Desde el punto de vista funcional, los receptores Fc γ R se dividen en receptores activadores y receptores inhibidores. Los receptores activadores (Fc γ RI, Fc γ RIIIa, Fc γ RIII, Fc γ RIV) tienen motivos ITAM (Motivo de activación basado en tirosina de inmunoreceptores) en su porción citoplasmática o en las de sus cadenas asociadas, mientras que el receptor inhibidor (Fc γ RIIb) expresa motivos ITIM (Motivo de inhibición basado en tirosina) (Figura 1).

Cada una de las distintas clases de receptores Fc γ no es exclusiva de un tipo celular particular. Más bien, la mayoría de las células hematopoyéticas expresan al mismo tiempo más de un tipo de receptor, y algunas expresan simultáneamente los tres. Aunque distintos tipos de receptores Fc γ R pueden unir IgG de distintas subclases con afinidades distintas, no existe una selectividad absoluta entre los distintos tipos de receptores por alguna(s) subclases de IgG (Ravetch y Anderson, 1990; Bruhuns, P. 2008). Por otro lado, se ha demostrado tanto en células que expresan de forma natural más de una isoforma de receptores Fc γ , así como en células transfectadas con distintas isoformas, que los Fc γ RIIa, IIa y IIIa pueden regular las mismas funciones, tales como fagocitosis, citotoxicidad celular

dependiente de anticuerpos (ADCC), y estallido respiratorio (Hutchinson et al, 1995; Segal, DM, 1990) (Tabla 1).

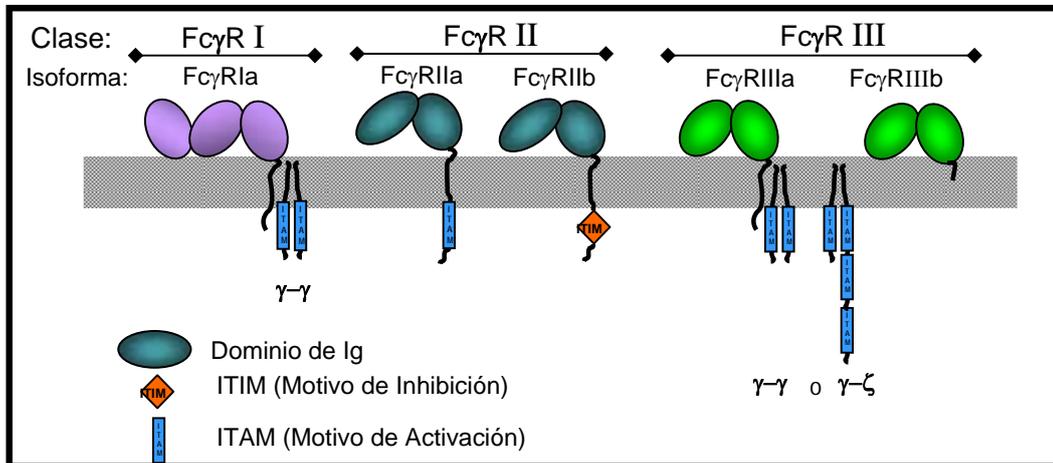


Figura 1. Representación esquemática de los receptores FcγRI, FcγRII y FcγRIII humanos. Todos los FcγR pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, tienen regiones extracelulares compuestas por 2 o 3 dominios de inmunoglobulinas. Los FcγRI y IIIa se expresan en membrana como complejos oligoméricos, las subunidades asociadas se muestran en la figura. Dentro de las tres clases de FcγR existen formas solubles que se generan por mecanismos distintos.

Los FcγR existen tanto como receptores de membrana así como en forma de moléculas solubles generadas por proteólisis de los receptores de membrana, o por procesamiento alternativo de los transcritos. Los receptores solubles retienen la afinidad por la IgG y pueden llevar a cabo varias funciones biológicas.

FcγRI (CD64)

Los receptores FcγRI son los receptores con la afinidad más alta por IgG ($K_a = 10^7 - 10^9 M^{-1}$). Se expresan en la membrana como un complejo entre una cadena α (alfa) que contiene el sitio de unión de la IgG, y un dímero de cadenas γ . El FcγRI se expresa constitutivamente en monocitos y macrófagos, y es inducible en neutrófilos y eosinófilos. La cadena α tiene un peso molecular entre 65 y 70 kDa, y tiene una región extracelular de 292 aminoácidos que contiene tres dominios homólogos a los dominios de inmunoglobulinas, una región transmembranal de 21 aminoácidos, y un dominio citoplásmico de 61 aminoácidos. El tercer dominio extracelular es característica particular del FcγRI, ya que los FcγRII y III sólo tienen dos dominios extracelulares. A este tercer dominio se le ha atribuido la alta afinidad del FcγRI por la porción Fc de la IgG.

Existen tres genes, altamente homólogos (98% de identidad de nucleótidos), que codifican para los Fc γ RI: A, B y C. Estos genes están formados por seis exones, dos de ellos codifican para un péptido líder, un exón para cada dominio extracelular y un solo exón para la región transmembranal y citoplásmica (Ernst et al, 1992). El hFc γ RIA genera un solo transcrito que codifica para una molécula con tres dominios de inmunoglobulina (Fc γ RIa); esta isoforma es la única cuya expresión en la membrana celular se ha demostrado. El hFc γ RIB genera dos transcritos: el Fc γ RIb1 y Fc γ RIIb que poseen dos dominios de inmunoglobulina y no tienen dominio transmembranal. En todas las células analizadas que expresan hFc γ RI se han encontrado los transcritos Fc γ RIa y Fc γ RIb2. El hFc γ RIC codifica para una proteína similar al Fc γ RIb, una forma soluble y de baja afinidad.

La cadena Fc γ RIa se asocia de manera no covalente con un dímero de cadenas gamma (γ) (Ernst et al, 1993). Las cadenas γ no son esenciales para la expresión del Fc γ RIa en la membrana celular, pero son indispensables para la transducción de señales a través de este receptor. Estas cadenas son fosforiladas en residuos de tirosina después de la agregación de los receptores, y estas fosfotirosinas sirven como punto de unión y activación de proteínas con actividad de cinasas (Santana et al, 1996).

Fc γ RII (CD32)

Son un grupo de receptores con baja afinidad por la IgG ($K_a < 10^7 M^{-1}$) expresados en todas las células hematopoyéticas que tienen Fc γ Rs, con excepción de las células NK. La familia del Fc γ RII consiste en al menos seis isoformas (a1, a2, b1, b2, b3 y c) generadas por procesamiento alternativo de tres genes diferentes (Fc γ RIIA, B, y C) (Hibbs et al, 1988). Todas las proteínas son muy similares, la mayor heterogeneidad entre ellas está en sus dominios citoplásmicos. Tienen una masa molecular de 40 kDa en células humanas y de 40-60 kDa en células murinas. Por análisis de cDNA se ha concluido que estas proteínas están formadas por una región extracelular de 180 aminoácidos que contiene dos dominios de inmunoglobulina, una región transmembranal formada por 27 a 29 aminoácidos, y un tallo citoplásmico de tamaño variable entre 44 y 76 aminoácidos).

Fc γ RIIA y Fc γ RIIC: La expresión de sus productos génicos está restringida a células de origen mielóide (monocitos, macrófagos y neutrófilos, megacariocitos y plaquetas). Están involucrados en diversas respuestas efectoras tales como fagocitosis, endocitosis, estallido respiratorio, y toxicidad celular dependiente de anticuerpos. El Fc γ RIIa2 no tiene región

transmembranal, así que probablemente es un receptor soluble. La agregación de los Fc γ RIIa induce la fosforilación de varias proteínas, incluyendo al mismo receptor, PLC γ 1, PLC γ 2, Vav y GAP, así como de las cinasas Syk, Lyn, Fgr, Fyn y PI3K. No se ha demostrado la asociación de otras cadenas con ninguno de los Fc γ RII, pero se sabe que su expresión en membrana y su capacidad de transducir señales no requieren de la expresión de ninguna cadena asociada.

Fc γ RIIB: Sus productos génicos se expresan principalmente en linfocitos B, monocitos y macrófagos. En células B se han encontrado los transcritos Fc γ RIIb1, IIb2 y IIc; en células mielomonocíticas se han encontrado mRNA de los genes IIa1, IIb1, IIb2 y IIc, mientras que en megacariocitos se encuentran principalmente los transcritos IIa. Las isoformas Fc γ RIIb1, IIb2 y IIb3 difieren solamente en un inserto de 19 aminoácidos contenido en la región cercana a la membrana en los Fc γ RIIb1 y IIb3.

El Fc γ RIIb participa en la regulación negativa de la activación de células B mediada por el BCR. También es capaz de regular negativamente la activación de funciones efectoras por distintos receptores para inmunoglobulinas, entre ellos los receptores para IgA, IgG e IgE. Esta capacidad de regulación negativa depende de una secuencia de aminoácidos (ITIM) que se encuentra en su región citoplasmática, cuya fosforilación permite el reclutamiento de fosfatasa de tirosina y de lípidos (D'Ambrosio et al, 1995).

Fc γ RIII (CD16)

Los Fc γ RIII son receptores con peso molecular entre 50 y 80 kDa, y con baja afinidad por IgG. Son codificados por dos genes diferentes, A y B, y existen al menos tres diferencias polimórficas entre los hFc γ RIII (Weinshank, R.L. 1988). Los productos de ambos genes codifican para proteínas con dominios extracelulares de 190 aminoácidos, con dos dominios de inmunoglobulinas.

El gene Fc γ RIIIA codifica para un receptor transmembranal de 224 aminoácidos, que se expresa en macrófagos, en células NK, en linfocitos B y en células T (subgrupo γ/δ). Los Fc γ RIIIa se encuentran expresados en membrana asociados no covalentemente con un dímero de proteínas unidas entre sí por puentes disulfuro. Estas proteínas pueden ser dímeros de cadenas γ , (que originalmente se describieron como componentes del receptor de alta afinidad para IgE), dímeros de cadenas ζ (las cuales también forman parte del receptor de células T), o heterodímeros de cadenas γ - ζ (Masuda et al, 1993). Estas cadenas

asociadas son requeridas para la expresión del Fc γ RIIIa, y además de prevenir su degradación en el retículo endoplásmico, son esenciales para la transducción de señales a través de este receptor. El Fc γ RIIIa murino se ha logrado expresar por transfección cuando se elimina su dominio intracitoplásmico, por lo que se piensa que este dominio tiene una secuencia de retención que previene que el receptor sea dirigido a la membrana si no se asocia con la subunidad γ en el retículo (Bonnerot et al, 1992). Este receptor puede mediar funciones efectoras como fagocitosis, ADCC y endocitosis. Su entrecruzamiento induce la fosforilación y la activación de las cinasas Lck y Syk, y la fosforilación de las proteínas PLC γ 1, PLC γ 2, PI3K, GAP y Vav.

El gene Fc γ RIIIB codifica para moléculas de superficie celular de 203 aminoácidos, que carecen de dominio transmembranal. Los Fc γ RIIIB se mantienen unidos a la membrana por medio de un glicosilfosfatidilinositol (GPI). Se han encontrado expresados solamente en neutrófilos. Debido a que no poseen segmentos transmembranal ni citoplásmico, el mecanismo de transducción para la activación de funciones efectoras a través de esta isoforma es todavía sujeto de discusión.

Receptores Fc γ R solubles

Existen formas solubles de las tres clases de Fc γ R, generadas por distintos mecanismos. El suero humano contiene altos niveles de Fc γ RIIIB soluble (shFc γ RIIIB) que probablemente es generado por la actividad de proteasas de serina en leucocitos polimorfonucleares. La activación de células NK da lugar a la liberación de hFc γ RIIIa soluble de manera dependiente de la actividad de metaloproteasas. Por otro lado, la generación de shFc γ RIIa parece debida a un mecanismo distinto, ya que esta isoforma carece de información para el dominio transmembranal y parece ser generada por procesamiento alternativo. Los hFc γ RI ilustran un tercer mecanismo de la generación de formas solubles, pues dos transcritos de sus genes contienen codones de paro, cuya traducción puede dar lugar a moléculas truncadas (receptores solubles). Se ha encontrado una correlación entre niveles elevados de shFc γ RIIIB con un menor riesgo de contraer infecciones, además de que la inyección de shFc γ RIIa junto con complejos inmunes inhibe la reacción de Arthus en ratas. Aún cuando la relevancia biológica de los receptores solubles no se ha demostrado, estos datos sugieren que podría tener efectos relevantes *in vivo*.

Tabla 1.- Características generales de los receptores Fc γ humanos:

Receptor	Genes	Transcritos	Subunidad asociada	Afinidad	Expresión	Inducción	Funciones
hFcγRI (CD64)	hFc γ RIA	hFc γ RIa	γ	10^8 - 10^9 M ⁻¹	Monocitos, macrófagos,	Neutrófilos (IFN γ ,C-CSF) Eosinófilos (IFN γ)	Fagocitosis, ADCC, Generación de metabolitos reactivos del oxígeno y secreción de citocinas.
	hFc γ RIB	shFc γ Rlb1 hFc γ Rlb2					
	hFc γ RIC	shFc γ Rlc					
hFcγRII (CD32)	hFc γ RIIA	hFc γ RIIa1 shFc γ RIIa2		< 10^7 M ⁻¹	Células hematopoyéticas nucleadas.		Fagocitosis, ADCC, Generación de metabolitos reactivos del oxígeno y secreción de citocinas. Las isoformas Fc γ RIIb tienen funciones inhibitorias
	hFc γ RIIB	hFc γ RIIb1 hFc γ RIIb2					
	hFc γ RIIC	hFc γ RIIc shFc γ RIIc					
hFcγRIII (CD16)	hFc γ RIIIA	hFc γ RIIIa	γ, ζ	$\pm 3 \times 10^7$ M ⁻¹	Monocitos.	Monocitos (TGF β).	Fagocitosis, ADCC, Generación de metabolitos reactivos del oxígeno y secreción de citocinas.
	hFc γ RIIIB	hFc γ RIIIb shFc γ RIIIb					

1.3.- Receptores Multicadena de Reconocimiento Inmune (MIRRs)

Los receptores para IgG comparten varias características estructurales y funcionales con otros receptores involucrados en el reconocimiento inmune, como el receptor de antígeno de linfocitos T (TCR), el receptor de antígeno de células B (BCR) y el receptor de alta afinidad para inmunoglobulina E (Fc ϵ RI) (Fig 2). Estos receptores se han agrupado en un conjunto llamado Receptores Multicadena de Reconocimiento Inmune (MIRR por sus siglas en inglés) (Keegan y Paul, 1992).

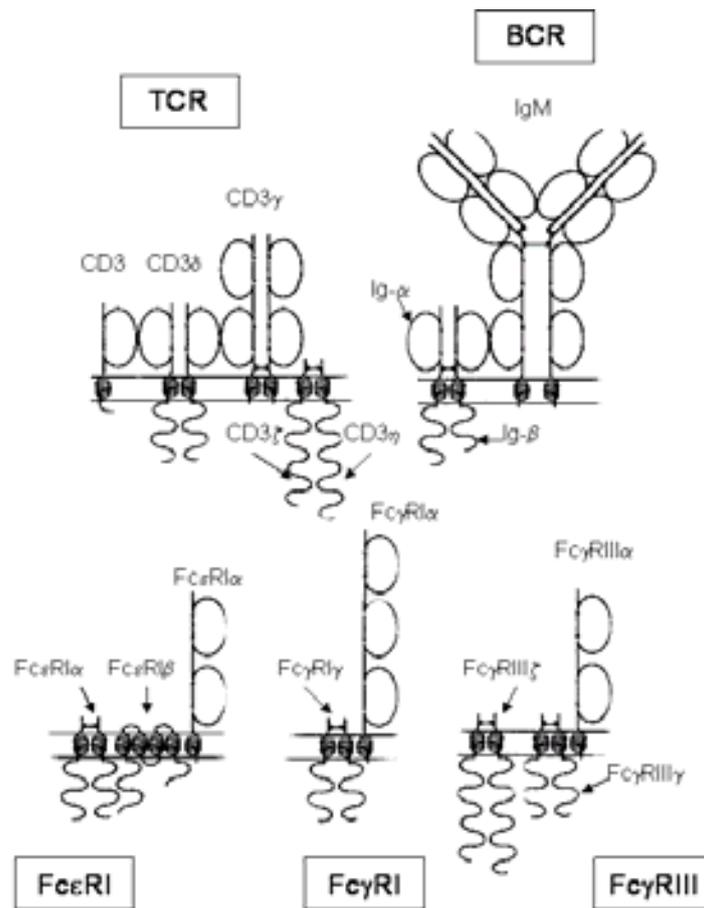


Fig. 2 Representación esquemática de la estructura de los Receptores Multicadena de Reconocimiento Inmune (MIRRs).

El TCR es un complejo que consiste en un heterodímero $\alpha\beta$, asociado a seis cadenas: una cadena $CD3\gamma$, una $CD3\delta$, dos $CD3\epsilon$ y dos ζ . El heterodímero $\alpha\beta$ contiene el sitio de unión del complejo MHC-péptido antigénico. En una subpoblación de células T el TCR está formado por cadenas $\gamma\delta$ en lugar de las cadenas $\alpha\beta$, y las cadenas ζ puede encontrarse sustituidas por cadenas $\zeta\eta$ o $\zeta\gamma$. El entrecruzamiento del TCR induce la secreción de citocinas, como

Interleucina 2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF, TNF, IFN γ , etc. El Receptor para antígeno de linfocitos B (BCR) es un complejo multiproteico compuesto por una molécula de inmunoglobulina unida a la membrana celular, y un heterodímero de cadenas Ig α /Ig β (CD79 α /CD79 β). El receptor de alta afinidad para IgE (Fc ϵ RI) que se expresa en células cebadas y basófilos, es un complejo formado por una cadena α asociada a una cadena β y a un homodímero de cadenas γ . El entrecruzamiento del Fc ϵ RI en mastocitos y basófilos da lugar a la liberación de gránulos preformados, que contienen histamina y una gran variedad de otras enzimas.

Existe un alto grado de homología en las cadenas asociadas a los MIRRs. La cadena γ que forma parte del complejo del Fc ϵ RI es la misma que se asocia al Fc γ RI y tiene un 55% de identidad en aminoácidos con una región de la cadena TCR ζ . Estudios de transfección han demostrado que el Fc ϵ RI y el TCR, así como el Fc γ RIII son expresados en la membrana celular sólo si un miembro de la familia de los genes ζ/γ está presente, y aparentemente, asociada al receptor. Las cadenas γ , ζ o η contienen en su porción citoplasmática, los motivos de activación basados en tirosina que son esenciales para la función del receptor.

1.3.1 Semejanzas estructurales y funcionales de los MIRRs

Las cadenas de los MIRRs que conforman el sitio de interacción con el ligando (el antígeno en caso del TCR y del BCR, o la Ig en el caso de los FcRs) tienen entre sí importantes semejanzas estructurales. Constan de una porción extracelular, responsable del reconocimiento del ligando, que se encuentra anclada en la membrana a través de un dominio transmembranal y posee un tallo citoplásmico corto. No tienen dominios con actividad enzimática intrínseca, por lo que requieren de la formación de complejos con otras proteínas, que son las cadenas asociadas, esenciales para acoplarse a la vía de transducción de señales. Las porciones extracelulares de los receptores pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas.

El dominio citoplásmico de las cadenas asociadas a los MIRRs contiene uno o varios motivos consenso caracterizados por un espaciamiento preciso de ciertos residuos de tirosina y leucina (D/ExxxxxxD/ExxYxxLxxxxxxYxxL/I). A esta secuencia consenso se le ha dado el nombre de ITAM por sus siglas en inglés (Motivo de activación basado en tirosina del inmunoreceptor) (Reth, 1989; Cambier, 1995). Este motivo se encuentra en la parte citoplasmática de las cadenas Ig α e Ig β del BCR, en la cadena β del Fc ϵ RI, en las cadenas

γ del $Fc\epsilon RI$, $Fc\gamma RI$ y $Fc\gamma RIII$, en las cadenas γ , δ y ϵ del CD3, y en las cadenas ζ y η del TCR.

Los ITAMs juegan un papel esencial en el acoplamiento de las vías de transducción de señales a través de los receptores que los contienen. Las tirosinas presentes en estos motivos son fosforiladas como consecuencia de la agregación de los receptores, creando sitios de unión para proteínas con actividad de cinasa, las cuales se unen a través de sus dominios SH2. Algunos receptores poseen varios ITAMs, por ejemplo, dentro del complejo TCR-CD3 cada cadena ζ posee tres ITAMs y las cadenas γ , δ y ϵ del CD3 tienen uno cada una. El significado de la variabilidad y multiplicidad de estos motivos aún no es claro, pero se ha observado que además de la gran importancia de las tirosinas que se fosforilan, los aminoácidos que las rodean son determinantes en la especificidad de la asociación del ITAM con los dominios SH2 de distintas proteínas (Clark et al, 1992; Kihara y Siraganian, 1994). Estas observaciones sugieren que cada receptor puede reclutar distintas proteínas dentro de los complejos de señalización, y que aún un mismo ITAM podría reclutar distintas proteínas dependiendo del entorno intracelular en que se encuentre.

Otra similitud entre los MIRRS es el mecanismo de activación. Se ha demostrado que para la activación celular a través de estos receptores no es suficiente la ocupación del receptor por su ligando, sino que es necesaria la agregación de los receptores (Metzger, 1992; Ortega, 1995). Aún mas, se ha demostrado que el entrecruzamiento de los receptores por anticuerpos específicos para sus cadenas (aún en ausencia de ocupación por el ligando), es suficiente para inducir la activación. La agregación de estos receptores sobre la membrana de las células, ya sea por interacción directa con el antígeno (BCR) o con fragmentos antigénicos (TCR), o bien indirectamente, a través de la interacción con anticuerpos, así como de manera experimental utilizando anticuerpos específicos, brinda la señal para que se inicie una cascada bioquímica intracelular que desemboca en la activación de diversas respuestas por la célula.

También existe entre los MIRRS una considerable similitud en las vías bioquímicas intracelulares que participan en la activación de la célula. Ninguno de los receptores tiene dominios con actividad enzimática intrínseca, pero se han encontrado proteínas que tienen actividad de cinasa asociadas a estos receptores o a sus cadenas. El evento bioquímico más temprano detectado después del entrecruzamiento de los receptores es la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina. Las cinasas de las familias Src y Syk/ZAP-70 juegan un papel central en los eventos de fosforilación implicados en las fases iniciales del mecanismo de transducción de señales por los MIRRS (Ortega, S. 2007).

1.3.2 Transducción de señales por MIRRs. Papel de las cinasas Src y Syk

Como se mencionó anteriormente, la agregación de los receptores MIRRs conteniendo ITAMs es necesaria para que se inicie la cascada de activación. Se ha postulado que la agregación de las cadenas con ITAMs amplifica la señal porque incrementa la concentración local de moléculas de señalización (Love y Shore, 2000). La agregación de los receptores inducida por la unión del ligando induce la activación de cinasas de la familia Src. La cinasa activa puede entonces fosforilar las tirosinas de los ITAMs de las cadenas de los receptores MIRRs, lo cual permite el reclutamiento de las cinasas Syk o ZAP-70. Las cinasas Syk y ZAP-70 contienen dos dominios SH2, que interactúan con las dos fosfotirosinas del motivo ITAM, y esta interacción induce la actividad catalítica de las cinasas.

Las cinasas Syk y/o ZAP-70 fosforilan otras proteínas celulares que participan en la señalización, incluyendo moléculas adaptadoras como LAT (linker for activation of T cells), BLNK (B cell linker protein) y SLP76 (SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa), lo que lleva a la formación de complejos de señalización en la membrana, facilitándose la activación de enzimas como la fosfatidil inositol-3 cinasa (PI3K), fosfolipasa C γ (PLC γ), y otras. La PLC γ actúa sobre fosfolípidos de inositol de la membrana, dando lugar a la generación de diacilglicerol (DAG) y de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3). El IP3 tiene receptores en el retículo endoplásmico, y su unión causa la liberación de iones Ca²⁺ almacenados, que actúan como segundos mensajeros (García-García E, 2002). El aumento de la concentración de Ca²⁺ en el citosol, aunado a la producción de DAG, da lugar a la activación de la proteína cinasa C ó PKC (cinasa de serina y treonina), con la resultante fosforilación de una serie de sustratos que participan en la respuesta celular (Fig 3).

Hay numerosas evidencias que apoyan el modelo de transducción de señales por MIRRs resumido arriba. Así por ejemplo, se ha demostrado que macrófagos derivados de ratones deficientes para las cinasas Hck, Fgr y Lyn, que son las principales cinasas de la familia Src expresadas en células mieloides, muestran una reducción muy importante en la fosforilación de los motivos ITAM, la activación de Syk, y la capacidad fagocítica (Fitzer-Attas *et al*, 2000). Además, mutaciones en las tirosinas de los motivos ITAM, o en los dominios SH2 de Syk, que impiden su asociación a los ITAM fosforilados, inhiben completamente las respuestas funcionales mediadas por receptores Fc (Ravetch y Bolland, 2001).

El papel de las cinasas es importante en la activación de funciones mediadas por receptores FcR, siendo diferente para cinasas de distintas familias, ya que el fenotipo con respecto a la fagocitosis de los ratones deficientes de las cinasas Hck, Fgr y Lyn, es diferente al fenotipo de los ratones deficientes de Syk: la falta de cinasas Src afecta la

polimerización de actina debajo de la copa fagocítica, mientras que la deficiencia de Syk impide el cerrado de la vesícula (Fitzer-Attas *et al*, 2000, Crowley *et al*, 1997)

1.3.3 Regulación negativa de la señalización por MIRRs

La activación de células a través de receptores que expresan ITAMs en muchos casos es regulada por receptores que expresan motivos de inhibición basados en tirosina de inmunoreceptores (ITIMs). El ITIM fue descrito por vez primera en los receptores Fc γ RIIb (Amignorena *et al*, 1992), pero posteriormente se demostró que su distribución es amplia (Daëron, M, 2008). Los receptores inhibitorios de la citotoxicidad de células asesinas naturales (NK) son un grupo creciente de receptores que restringen la muerte de células blanco que expresan proteínas MHC de clase I específicas. Varios receptores de este grupo contienen ITIMs o se asocian a proteínas que los contienen. En el ratón existe un grupo de receptores inhibitorios de la citotoxicidad, que pertenecen a la familia de las lectinas diméricas Ly-49, tienen un ITIM e inhiben la citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por el Fc γ RIII en células NK. Otro grupo de receptores inhibitorios que se expresan en células humanas (KIRs) pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, contienen dos ITIMs, y funcionan como receptores inhibitorios tanto en células NK como en células T. El CD22 es una proteína perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresa en células B y tiene tres ITIM. La agregación de esta molécula causa una fuerte señal inhibitoria en la estimulación de las células B. Las proteínas gp49B1y MAFA son moléculas transmembranales que se encuentran en células mastoides e inhiben la degranulación inducida por Fc ϵ RI. La proteína gp49 pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y contiene dos ITIM, mientras que MAFA pertenece a la superfamilia de las lectinas y solo contiene un ITIM.

En muchos casos, incluyendo a los receptores Fc γ Rs, el receptor con ITIM reconoce el mismo ligando que el receptor que expresa ITAM, regulando directamente la activación. Al igual que los ITAM, los ITIMs son fosforilados por cinasas de la familia Src, pero en estos casos el ITIM fosforilado recluta proteínas con actividad de fosfatasa, incluyendo las fosfatasas de tirosina SHP-1 y SHP-2, así como la fosfatasa de fosfolípidos SHIP. Las fosfatasas de tirosina SHP-1 y SHP-2 defosforilan los ITAM y otras proteínas, mientras que SHIP actúa sobre los fosfolípidos de inositol producidos por la vía de la PI3-K.

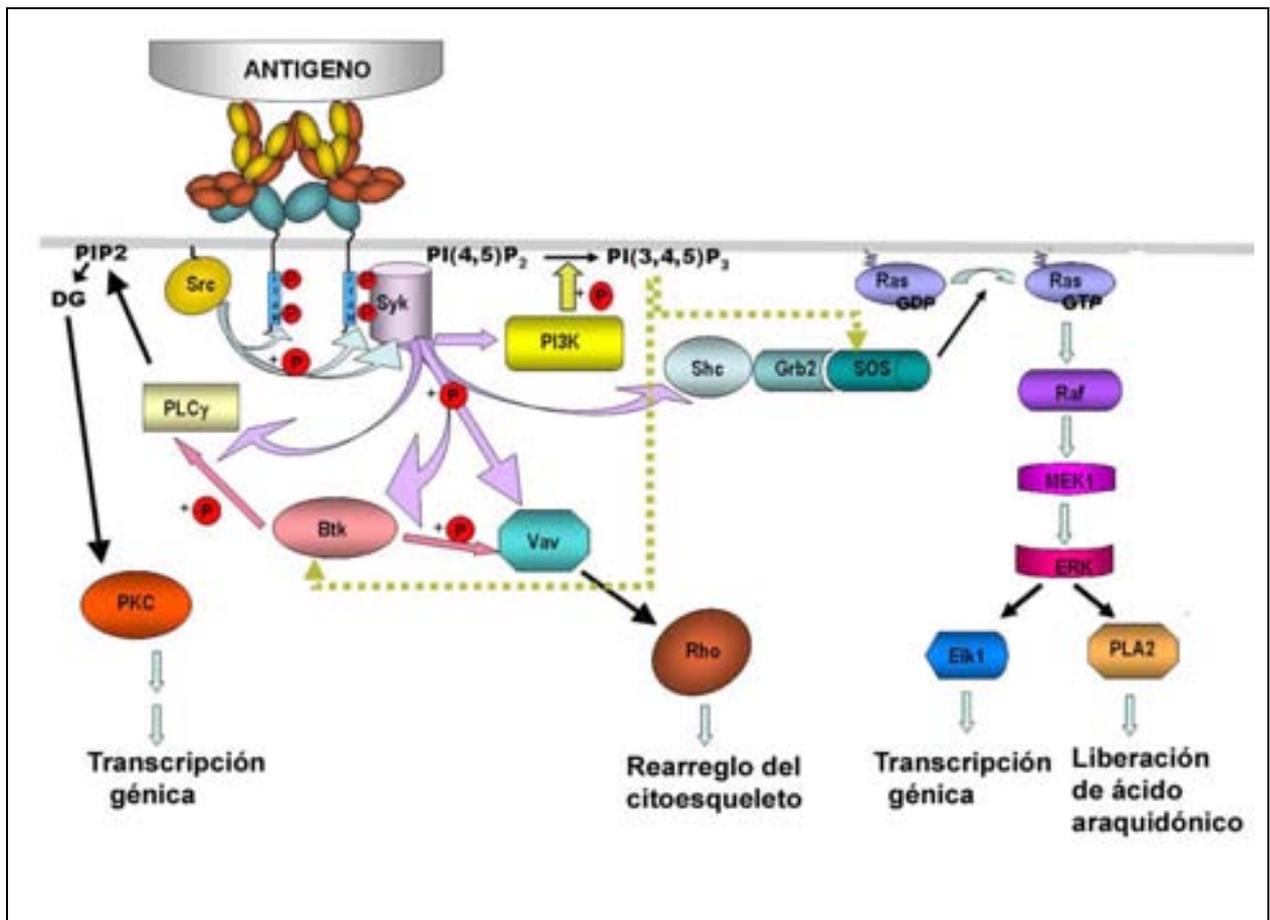


Fig. 3. Esquema simplificado de las señales bioquímicas iniciadas por el entrecruzamiento de los $Fc\gamma R$. El entrecruzamiento de los $Fc\gamma R$ inducido por inmunocomplejos conteniendo IgG o por partículas opsonizadas con IgG induce la activación de cinasas de la familia Src (Lyn) las cuales fosforilan los ITAMs de los receptores agregados. Syk es reclutada a los ITAMs fosforilados a través de sus dos dominios SH2 y su fosforilación, mediada tanto por la cinasa Src como por autofosforilación, induce su activación. Una vez activa, Syk fosforila varias moléculas que participan en distintas rutas de señalización. Un sustrato de Syk es la cinasa de fosfatidil inositol 3-fosfato (PI3K), la cual fosforila el $PI(4,5)P_2$ generando $PI(3,4,5)P_3$, que funciona como sitio de anclaje para el reclutamiento y activación de moléculas con dominios de homología a pleckstrina (PH), como Btk. Otro sustrato de Syk es la molécula adaptadora Vav, que participa en la activación de GTPasas pequeñas de la familia Rho involucradas en el rearrreglo del citoesqueleto.

I.4. El sistema fagocítico mononuclear.

Los monocitos son parte del sistema fagocítico mononuclear que incluye a macrófagos, células dendríticas (DC), monocitos y sus progenitores de médula ósea. Los monocitos se originan en la médula ósea a partir de un progenitor mielóide, y una vez formados, son liberados a la sangre permaneciendo en circulación entre 7 y 10 días antes de

entrar a los tejidos y diferenciarse en macrófagos o células especializadas como las células dendríticas o los osteoclastos. Los monocitos maduros constituyen del 5 al 10% de los leucocitos totales de sangre periférica en humanos y su morfología es muy heterogénea variando en tamaño, grado de granularidad y morfología nuclear. En un humano adulto sano hay entre 300 y 700 monocitos por mililitro de sangre. Son células pequeñas, con un diámetro promedio entre 12 y 15 μm .

En diferentes mamíferos, entre ellos humanos, ratones, ratas y cerdos se ha encontrado heterogeneidad en la expresión de marcadores de superficie de los monocitos, lo que ha permitido definir subpoblaciones. Inicialmente los monocitos humanos fueron caracterizados como células con alta expresión de CD14 en su membrana. Más tarde se descubrió que la expresión de este marcador de superficie y de otros, como CD16 y CD64, era variable entre los monocitos y se definieron tres subgrupos de monocitos: CD14^{hi}CD16⁻CD64⁺ (también llamados monocitos clásicos por ser los que poseen la mayoría de las características originalmente descritas para los monocitos) que expresan mayor cantidad de CCR2 y CD62L; monocitos CD14⁺CD16⁺CD64⁻ que expresan mayor cantidad de MHC II, CD86 y CCR5 (que han sido llamados monocitos "residentes"); y monocitos CD14⁺CD16⁺CD64⁺ que tienen una gran expresión de CD86 y HLA-DR. En cultivo, los dos primeros subtipos de monocitos se pueden transformar en DC en presencia de GM-CSF e IL-4, pero en el modelo de migración transendotelial *in vitro*, los CD14⁺CD16⁺CD64⁻ se diferencian más frecuentemente a DC que el subtipo clásico.

El tercer subtipo, con el fenotipo CD14⁺CD16⁺CD64⁺ parece combinar características tanto de monocitos como de DC. Al igual que los clásicos, los monocitos CD14⁺CD16⁺CD64⁺ tienen una alta actividad fagocítica y producen grandes cantidades de citocinas, cosa que los CD14⁺CD16⁺CD64⁻ no hacen. Lo que tienen en común con éstos últimos es que tienen una gran capacidad estimuladora de linfocitos T. A partir de los estudios sobre la heterogeneidad de monocitos de ratón y humanos, se ha empezado a definir un esquema (Gordon y Taylor, 2005) según el cual los monocitos salen de la medula ósea a circulación con el fenotipo clásico. En ausencia de un proceso inflamatorio, adquieren un fenotipo intermedio entre el clásico y el residente. Tanto los monocitos de fenotipo clásico como intermedio pueden responder a señales inflamatorias migrando a tejidos en los que haya procesos inflamatorios en curso, y diferenciarse ahí en macrófagos inflamatorios. En ausencia de procesos inflamatorios, los monocitos en circulación sufren una alteración de su fenotipo hacia el fenotipo residente; estos monocitos entran a los tejidos para renovar las poblaciones de macrófagos y DCs residentes en tejidos.

Los macrófagos de los tejidos tienen una importante función manteniendo la homeostasis tisular a través de la fagocitosis de células senescentes, y la remodelación y reparación de tejidos después de la inflamación. Generalmente se considera que derivan de los monocitos circulantes. Los macrófagos están distribuidos por todo el organismo, presentando una gran heterogeneidad estructural y funcional entre macrófagos de diferentes sitios anatómicos. Se encuentran principalmente en órganos linfoides, hígado, riñones, tracto gastrointestinal, sistema nervioso central, cavidades serosas, huesos, sinovio y piel, y participan en un amplio rango de procesos fisiológicos y patológicos.

Existe un alto grado de heterogeneidad entre macrófagos, que refleja la especialización de funciones que han adoptado estas células en diferentes localizaciones anatómicas. Como ejemplo de especialización se puede mencionar la habilidad de los osteoclastos para remodelar hueso, la gran expresión de PRRs (receptores de reconocimiento de patrones) y receptores scavenger por macrófagos alveolares, la gran capacidad para fagocitar cuerpos apoptóticos de los macrófagos del timo y de la pulpa blanca del bazo, la alta capacidad fagocítica y bactericida conjugada con una baja producción de citocinas proinflamatorias de los macrófagos de la lámina propia, etc. El microambiente tisular puede influir sobre el fenotipo de los macrófagos que se encuentran en ese órgano, pero además, los microambientes dentro de un mismo órgano pueden favorecer la presencia de diferentes tipos de macrófagos.

A pesar de la clasificación que se han postulado de los macrófagos en distintos estados de activación, el grado de plasticidad que puede haber en la activación es todavía incierto. No se sabe si el destino de los macrófagos se define en una sola ocasión o si es susceptible de ser modificado, y también se desconoce si los diferentes estados de activación tales como se han descrito *in vitro* existen como tales *in vivo*, o si más bien, cada macrófago puede mostrar estados de activación dentro de un rango mucho más amplio, lo que es muy probable debido a que en un ambiente inflamatorio el macrófago puede estar expuesto a una gran variedad de estímulos.

1.4.1. Funciones efectoras de los fagocitos mononucleares.

Los fagocitos mononucleares, incluyendo a los monocitos y macrófagos, se encuentran entre las células más pleiotrópicas del organismo, pues llevan a cabo una gran cantidad de funciones biológicas. Son células con una alta capacidad fagocítica y microbicida, pero sus funciones de ninguna manera se limitan a este aspecto. Son células citotóxicas, y pueden también procesar y presentar antígeno a linfocitos T. Son células con

un alto potencial secretor, habiéndose caracterizado cientos de productos de secreción de monocitos/macrófagos, incluyendo enzimas (lisozima, hidrolasas ácidas, proteasas, lipasas, etc), inhibidores de enzimas, factores de sistema del complemento, factores de coagulación, etc. Producen además una gran variedad de citocinas, a través de las cuales pueden modular la activación de células como linfocitos, neutrófilos, células endoteliales, etc.

La estimulación de los fagocitos mononucleares por interacciones ligando-receptor a menudo resulta en un gran incremento en el metabolismo de glucosa y en el consumo de oxígeno. Este fenómeno se denomina estallido respiratorio, y es consecuencia de la actividad del complejo enzimático de la citocromo-oxidasa, el cual se encuentra unido a membrana, y que cataliza la reducción de oxígeno molecular a superóxido. El superóxido es convertido en el fagosoma y en el medio extracelular en peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, especies responsables de la actividad microbicida.

La estimulación va acompañada de la liberación de productos como proteasas lisosomales neutras, hidrolasas ácidas, componentes del complemento, inhibidores enzimáticos, citocinas (entre ellas IL-1, IL-6, TNF- α) y factores promotores de la hematopoyesis. Otras consecuencias de la activación a través de interacciones ligando-receptor son: la liberación de ácido araquidónico de las pozas celulares de fosfolípidos, por acción de la fosfolipasa A2, y la generación de prostaglandinas y leucotrienos a partir del ácido araquidónico, por las vías de la ciclooxigenasa o de la lipooxigenasa, respectivamente. Los fagocitos mononucleares tienen un gran número de receptores de superficie que determinan el control de las actividades celulares como el crecimiento, la diferenciación, la activación, la migración, la secreción y la fagocitosis.

Entre los receptores más estudiados se encuentran los receptores para Fc de las inmunoglobulinas y los receptores tipo 3 para componentes del complemento (CR3). La unión de la porción Fc de las Ig a su receptor puede activar diversas funciones como la endocitosis, la reorganización del citoesqueleto en el sitio de unión facilitando la fagocitosis, y la secreción de mediadores de la inflamación. Los receptores para complemento están involucrados en la unión e ingestión de partículas opsonizadas. Además, poseen también receptores para citocinas (IL-1, 2, 3, 4, IFN α , β y γ , etc.), para péptidos y moléculas pequeñas (péptidos formilados, etc.), para oligo ó lipopolisacáridos (receptor de manosa, CD14, etc), receptores de adhesión y migración (moléculas de adhesión como LFA-1 y VLA-4), etc. Algunos de estos receptores de superficie son capaces de mediar actividad fagocítica, como los receptores para manosa, los receptores para el tercer componente del complemento y los receptores para Fc de IgG.

Las células fagocíticas profesionales, como los macrófagos y los neutrófilos, son elementos centrales en la inmunidad innata y en la inmunidad adquirida. Los neutrófilos son, en general, fagocitos más eficientes, pero cuando se trata de partículas grandes en relación con el tamaño de la célula, o cuando la carga microbiana es grande, la fagocitosis por macrófagos es más importante. Así, los macrófagos representan un componente crucial de la defensa contra la invasión de una gran variedad de microorganismos, incluyendo bacterias, virus, hongos y protozoarios.

1.4.2. Transducción de señales y diferenciación de células monocíticas

Como se mencionó antes, los macrófagos y células relacionadas están presentes en la mayoría de los tejidos. Se sabe además que los macrófagos residentes en distintos tejidos, y aún los de un mismo tejido, muestran una gran heterogeneidad fenotípica. Tal heterogeneidad puede reflejar la adaptación funcional a los distintos sitios anatómicos durante la diferenciación de los monocitos hacia las distintas subpoblaciones de macrófagos. Los mecanismos por los cuales se genera esta diversidad fenotípica no están bien definidos, pero se sabe que está influenciada por factores del medio ambiente en el cual se lleva a cabo el proceso de diferenciación. Entre estos factores podemos citar: variaciones en la concentración relativa de componentes plasmáticos, la presencia de citocinas y/o factores de crecimiento; la presencia de productos microbianos; la señalización mediada por contactos célula-célula, etc. Las combinaciones e interacciones posibles entre todos estos factores hacen que *in vivo* la diferenciación de monocitos transcurra por diferentes vías dando lugar a la vasta heterogeneidad fenotípica de estas células (Auger y Ross, 1992). Ante la imposibilidad práctica de estudiar *in vivo* los cambios que ocurren a nivel bioquímico durante la diferenciación de monocitos, se ha intentado establecer modelos *in vitro* de estos procesos de diferenciación. Los primeros acercamientos lograron demostrar que en líneas de células monocíticas se pueden inducir cambios similares a los que ocurren durante los procesos de diferenciación utilizando distintos agentes, como INF- γ , PMA, y VD3 (1 α -25, dihidroxi Vitamina D3) que dan lugar a poblaciones celulares con distintos fenotipos (Botling et al, 1996; Oberg et al, 1993; James et al, 1997; Auwerx et al, 1992; Kreutz y Andreesen, 1990).

Es probable que los procesos de diferenciación pudieran alterar la activación de funciones efectoras, tanto como consecuencia de cambios en la expresión de receptores en membrana, como por efectos sobre la expresión de proteínas intracelulares involucradas en la señalización. En el caso de la señalización por Fc γ Rs, aparte de posibles cambios en la

expresión en membrana de los distintos tipos de Fc γ Rs, la diferenciación puede modificar las concentraciones relativas de proteínas capaces de interactuar con los ITAMs fosforilados, lo cual puede ser determinante para la composición de los complejos de transducción de señales. Esto es posible en virtud de que la especificidad de la interacción entre los motivos ITAM fosforilados y las proteínas con dominios SH2 no es absoluta (Cantley y Songyang, 1994), ya que se ha visto que en células deficientes de una cinasa de la familia Src, otros miembros de la misma familia pueden sustituirla (Hunter et al, 1993). También se ha demostrado la asociación de al menos tres cinasas de la familia Src diferentes (Fyn, Lyn y Fgr), al receptor Fc γ R11a (Ghazizadeh et al, 1994). Esta promiscuidad en las interacciones de los ITAM fosforilados con distintas proteínas que tienen dominios SH2, podrían dar al sistema cierta plasticidad, permitiendo el acoplamiento del mismo receptor a distintas vías de activación, dependiendo de factores hasta hoy no dilucidados. Por lo anterior, si se modifican los niveles de expresión de las proteínas que se unen a los ITAM, y de otras proteínas que intervienen en la cascada de señalización a través de Fc γ Rs, podríamos esperar que las vías bioquímicas de activación muestren diferencias, y por tanto, la respuesta celular también sea distinta.

1.5 Planteamiento del problema

Tratando de dilucidar los mecanismos bioquímicos por los cuales los Fc γ Rs median la activación celular, se han estructurado cascadas de señalización muy complejas, y en algunos puntos hasta redundantes. Los estudios utilizados para estructurar las cascadas de señalización han sido realizados por diferentes grupos de investigación, y por tanto, han sido realizados con importantes variaciones experimentales, entre ellas, el modelo experimental, ya que utilizan diferentes líneas celulares, poblaciones heterogéneas de monocitos purificados de distintos donadores, e incluso, diferentes tipos celulares que expresan estos receptores.

Es bien sabido que el estado de diferenciación influye en la expresión de algunas moléculas, (tanto intracelulares como de superficie) que se expresan en las células monocíticas, sin embargo, no se ha estudiado con detalle la influencia del estado de diferenciación sobre la respuesta celular mediada por los receptores Fc γ . Dado que el contexto celular en el que se encuentre el ITAM (el tipo celular y su estado de diferenciación o activación) puede ser determinante en la composición de los complejos de transducción de señales, y dado que en las células de un mismo linaje en diferentes estados de diferenciación o de activación, se expresan proteínas con diferencias cualitativas y cuantitativas, las vías bioquímicas podrían ser moduladas de manera diferente, dando lugar a respuestas celulares diferentes. En particular, las proteínas que participan en los eventos tempranos de señalización (quinasas de la familia Src y Syk), podrían tener una amplia influencia en la formación de los complejos que influyen en la respuesta celular.

II.- HIPÓTESIS:

El nivel de fosforilación de las cinasas Lyn y Syk inducido por la agregación de los receptores Fc γ RI y Fc γ RIIa es modulado por el estado de diferenciación celular en células monocíticas.

III.- OBJETIVOS

Estudiar el nivel de fosforilación de las cinasas Lyn y Syk después de la estimulación a través de los receptores Fc γ RI y Fc γ RIIa en células monocíticas en distintos estadios de diferenciación.

- * Obtener poblaciones celulares en distintos estados de diferenciación
- * Determinar el nivel de fosforilación de las cinasas Syk y Lyn inducida por un mismo receptor Fc γ en células monocíticas en diferentes estados de diferenciación.
- * Comparar el nivel de fosforilación de las cinasas Syk y Lyn inducida por la agregación de los Fc γ RI vs Fc γ RIIa en células monocíticas en diferentes estados de diferenciación.

IV.- MATERIALES Y METODOS

IV.1.- Modelo experimental

Las poblaciones celulares normales son las más relevantes en el estudio de la acción de diversos factores sobre las células inmunes, pero el análisis bioquímico de los mecanismos de transducción de señales, como la fosforilación de proteínas reguladoras que son de baja abundancia, a menudo requiere de un gran número de células, haciendo necesario el uso de cultivos de líneas celulares. Para alcanzar los objetivos de este trabajo requerimos grandes cantidades de células conformadas por poblaciones homogéneas, por lo que se utilizaron dos líneas celulares monocíticas de origen humano: THP-1 y U-937. Estas células, al igual que los monocitos humanos obtenidos de sangre periférica de personas sanas, expresan receptores Fc γ RI y Fc γ RII, y se ha demostrado que la agregación de estos receptores induce eventos bioquímicos similares a los que ocurren en células monocíticas humanas, como son la fosforilación de proteínas en tirosina, el aumento de calcio intracelular, la hidrólisis de fosfolípidos de inositol, etc. Por tanto, se consideran un modelo adecuado para el estudio de los eventos bioquímicos iniciados por estos receptores Fc γ R, como lo prueba el alto número de publicaciones en que han sido empleadas como modelo experimental para estos estudios.

a) Líneas celulares utilizadas:

U-937: (ATCC CRL 1597). Es una línea celular obtenida a partir de un linfoma histiocítico humano. Conserva muchas de las características de las células monocíticas, por ejemplo: expresan receptores para Fc y C3, fagocita eritrocitos opsonizados con anticuerpos y perlas de látex. Se tiñen fuertemente en pruebas para lisozima no específica, carecen de inmunoglobulinas de superficie. Pueden ser inducidas a diferenciación con sobrenadantes de linfocitos humanos cultivados, ésteres de forbol, vitamina D3, ácido retinoico, Interferón γ y TNF. Las células U-937 tienen 18,000 sitios de unión para IgG1 ($K_a \approx 10^8 \text{ M}^{-1}$) mientras que los monocitos humanos tienen 20,200 sitios con una K_a de $8.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$.

THP-1: (ATCC TIB 202). Es una línea celular obtenida de una leucemia monocítica aguda, de sangre periférica humana. Las células expresan receptores para Fc y C3b. Fagocitan eritrocitos opsonizados y perlas de látex. Son positivas a la tinción para α -naftil butirato esterasa, producen lisozima y carecen de inmunoglobulinas de superficie y citoplásmicas. Muestran incremento en la producción de O_2^- durante la fagocitosis y pueden ser inducidas a

diferenciación hacia células parecidas a macrófagos.

b) Cultivos de células U-937 y THP-1

El medio RPMI se preparó según las instrucciones del fabricante. Después de la prueba de esterilidad se complementó con L-Glutamina (Sigma) 2mM, Estreptomina (Sigma) 0.01 mg/mL, Penicilina G (Sigma) 100 U/mL, aminoácidos no esenciales (GIBCO) 0.1Mm, Piruvato de sodio (GIBCO) 1mM y 10% de Suero Fetal Bovino inactivado por calor (GIBCO). Las células se cultivaron en condiciones de esterilidad, en botellas de plástico con medio RPMI complementado. Se mantuvieron a 37°C, en una atmósfera húmeda, con 5% de CO₂. Para cambiar el medio de cultivo cuando ha cambiado el pH las células se centrifugaron a 1500 RPM durante 3 minutos, se retiró el medio y se resuspendieron en medio fresco, a una concentración de 1X10⁵/ mL de medio.

IV.2.- Anticuerpos monoclonales específicos para FcγRI yFcγRII

Los anticuerpos monoclonales utilizados para la estimulación celular fueron obtenidos a partir de hibridomas obtenidos del ATCC (American Type Culture Collection). El hibridoma 32.2 produce un anticuerpo monoclonal de clase IgG₁ específico para el receptor FcγRI humano, el hibridoma IV.3 produce un anticuerpo monoclonal de la clase IgG_{2b} que es específico para el FcγRII humano.

a) Obtención de los anticuerpos anti-Fcγ. Los hibridomas IV.3 y 32.2 se crecieron a confluencia en medio DMEM y los anticuerpos se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo. Alternativamente, los anticuerpos se purificaron a partir de líquido de ascitis. Para la producción de ascitis, se inocularon 1X10⁶ células de hibridomas, vía intraperitoneal, en ratones inyectados con Pristán 14 días antes de la inoculación de las células. Diez días después de la inoculación de las células se obtuvo el líquido de ascitis por punción peritoneal.

b) Purificación de los anticuerpos anti-Fcγ. Ambos anticuerpos monoclonales se purificaron por cromatografía de afinidad a partir del líquido de ascitis o del sobrenadante siguiendo el mismo protocolo. El ascitis se centrifugó a 12,000 RPM durante 15 mins. Se ajustó el pH agregando 1 mL de Tris 2 M (pH 8.2) por cada 50 mL de ascitis. Los sobrenadantes se incubaron con 2 mL de perlas de Sefarosa-Proteína A para los anticuerpos

IV.3, o de Sefarosa-Proteína G para los anticuerpos 32.2. La incubación se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C, y la mezcla de perlas y sobrenadante se pasó por una columna para recuperar las perlas conteniendo los anticuerpos. La columna se lavó con una solución de Tris conteniendo 0.1 M y NaCl 0.15 M (pH 8.2) hasta obtener lavados con una densidad óptica a 280 nm menor a 0.05. Los anticuerpos se eluyeron pasando por la columna varias alícuotas de 1 mL de glicina 0.2 M (pH 2.8), el eluido se recuperó en tubos conteniendo 50 µl de Tris 2 M pH 8.2, y la concentración de anticuerpos en los eluidos, se determinó a partir de la densidad óptica a 280 nm, usando la relación $1DO = 0.8 \text{ mg/mL}$

c) Fragmentación de anticuerpos

La pepsina es una endopeptidasa no específica que tiene actividad catalítica a pH ácido, y que se desnaturaliza irreversiblemente en pH neutro o alcalino. Mediante la digestión con pepsina se pueden obtener fragmentos $F(ab')_2$ y Fab' de anticuerpos IgG de diversas subclases de varias especies, sin embargo, la IgG1 murina es resistente a la digestión por esta enzima.

La ficina es una tiol-proteasa que puede digerir la IgG1 en fragmentos Fc y Fab o $F(ab')_2$, dependiendo de la concentración de cisteína usada y de otras condiciones experimentales (pH, tiempo de digestión, etc).

Los fragmentos Fc y los anticuerpos no digeridos pueden separarse por unión a proteína A inmovilizada.

Fragmentación de anticuerpos 32.2.- La fragmentación se llevó a cabo utilizando ficina inmovilizada, de acuerdo a las instrucciones del proveedor (PIERCE). Los anticuerpos se concentraron a 8 mg/mL y el tiempo de incubación con la ficina fue de 5 hrs. Después de la digestión, los anticuerpos se incubaron con 2 mL de Sefarosa-Proteína A durante 2 hrs a 4°C. Las perlas de Sefarosa-Proteína A se centrifugaron para retirar los fragmentos Fc y el anticuerpo no digerido, quedando los fragmentos Fab' en el sobrenadante. Los fragmentos obtenidos se dializaron contra PBS y se analizaron por SDS-PAGE visualizándolos por tinción con azul de Coomassie.

Fragmentación de anticuerpos IV.3.- Se utilizó pepsina inmovilizada de acuerdo con las instrucciones del proveedor (PIERCE). Se lavaron 187.5 µl de agarosa-pepsina con amortiguador de digestión (acetatos 20 mM, pH 4.5), se resuspendieron en 375 µl del mismo amortiguador, se incubaron con 882 µl de anticuerpo IV.3 (concentrado a 15 mg/mL) durante

3 hrs y media, a 37° con agitación suave. La pepsina inmovilizada se separó por centrifugación. Dos mL de Proteína A se lavaron con 7.5 mL de acetato de sodio 5 mM pH 4.5 y se resuspendieron en 1.25 mL de Tris 10 mM, pH 7. Después de la digestión, los anticuerpos se incubaron con 2 mL de Sefarosa-Proteína A durante 2 hrs a 4°C. Las perlas de Sefarosa-Proteína A se centrifugaron para retirar los fragmentos Fc y el anticuerpo no digerido, quedando el fragmento Fab' en el sobrenadante. Los fragmentos obtenidos se dializaron contra PBS y se analizaron por SDS-PAGE visualizándolos por tinción con azul de Coomassie.

IV.3.- Inducción de diferenciación celular

a) Tratamiento con 1 α ,25-dihidroxi-vitamina D3 100 nM (VD3):

Cinco millones de células monocíticas se sembraron en 30 mL de RPMI complementado (con 5% de SFB), en cajas de petri de 14.0 cm de diámetro, y se añadieron 30 μ l de una solución stock de VD3 (100 μ M). Se incubaron a 37°C en atmósfera con CO₂ al 5% durante 24 hrs, posteriormente, las células se resuspendieron y se retiraron 10 mL, añadiendo 10 mL de RPMI y 10 μ l de VD3 (100 μ M). A las 48 hrs de incubación las células se centrifugaron a 1300 RPM, se retiró el sobrenadante, y se resuspendieron en 30 mL de medio fresco, añadiendo 30 μ l de VD3 (100 μ M). A las 72 hrs de tratamiento, las células se resuspendieron con pipetas de 10 mL, y se colectaron todas las células de la caja enjuagándola con PBS, mediante pipeteos suaves.

b) Tratamiento con forbol-miristato-acetato 50 nM (PMA):

Cinco millones de células monocíticas se sembraron en 30 mL de RPMI complementado con 5% de SFB, en cajas de petri de 14.0 cm de diámetro, y se añadieron 30 μ l de una solución stock de PMA (50 μ M). Se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 hrs. Las células se resuspendieron y se retiraron 10 mL, añadiendo 10 mL de RPMI y 10 μ l de PMA (50 μ M). A las 48 hrs de incubación las células se centrifugaron a 1300 RPM, se retiró el sobrenadante, y se resuspendieron en 30 mL de medio fresco, añadiendo 30 μ l de PMA 50 μ M. A las 72 hrs de tratamiento, las células se tripsinizaron y se resuspendieron con pipetas de 10 mL, y se colectaron todas las células de la caja enjuagándola con PBS, mediante pipeteos suaves.

c) Tratamiento con ácido retinoico 1 μ M (RA):

Cinco millones de células monocíticas se sembraron en 30 mL de RPMI complementado con 5% de SFB, en cajas de petri de 14.0 cm de diámetro, y se añadieron 30 μ l de una solución stock de RA (1 mM). Se incubaron a 37°C en atmósfera con CO₂ al 5% durante 24 hrs. Las células se resuspendieron y se retiraron 10 mL, añadiendo 10 mL de RPMI y 10 μ l de RA (1 mM). A las 48 hrs de incubación las células se centrifugaron a 1300 RPM, se retiró el sobrenadante, y se resuspendieron en 30 mL de medio fresco, añadiendo 30 μ l de RA 1 mM. A las 72 hrs de tratamiento, las células se resuspendieron con pipetas de 10 mL, y se colectaron todas las células de la caja enjuagándola con PBS, mediante pipeteos suaves.

d) Tratamiento con interferón- γ 100 U/ml (IFN γ):

Cinco millones de células monocíticas se sembraron en 30 mL de RPMI complementado con 5% de SFB, en cajas de petri de 14.0 cm de diámetro, y se añadieron 30 μ l de una solución stock de IFN γ (100,000 U/mL). Se incubaron a 37°C en atmósfera con CO₂ al 5% durante 24 hrs. Las células se resuspendieron y se retiraron 10 mL, añadiendo 10 mL de RPMI y 10 μ l de IFN γ 100,000 U/mL. A las 48 hrs de incubación las células se centrifugaron a 1300 RPM, se retiró el sobrenadante, y se resuspendieron en 30 mL de medio fresco, añadiendo 30 μ l de IFN γ 100,000 U/mL. A las 72 hrs de tratamiento, las células se resuspendieron con pipetas de 10 mL, y se colectaron todas las células de la caja enjuagándola con PBS, mediante pipeteos suaves.

IV.4.- Determinación de la expresión de antígenos de membrana por inmunofluorescencia indirecta.

Las células se lavaron por centrifugación y se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 /mL, en PBS con SFB al 5% y azida de sodio 0.1% (amortiguador de lavados). Se colocaron 0.5 mL de células en tubos para FACS y se añadieron 2 μ g del primer anticuerpo (anti-antígeno). Se incubaron durante 60 minutos a 4°C, resuspendiendo ocasionalmente. Se centrifugaron y se retiró el sobrenadante, se lavaron dos veces con 1 mL de amortiguador de lavados y se resuspendieron en 0.2 mL de una dilución 1:300 del segundo anticuerpo en el amortiguador de lavados. Se incubaron durante 60 min a 4°C, protegidos de la luz y resuspendiendo ocasionalmente. Se lavaron dos veces con 1 mL de amortiguador de lavados y una vez con PBS frío, se resuspendieron en 0.8 mL de paraformaldehído al 1% en PBS durante 25-30 mins. Se lavaron una vez con buffer de lavados y una vez con PBS. Se

resuspendieron en PBS a 1×10^6 células/mL. Las muestras se conservaron en oscuridad, a 4°C, hasta el análisis en el citofluorómetro (FACScan).

Para los lavados, las centrifugaciones se hicieron a 1000 RPM durante 3 minutos. Los sobrenadantes se retiraron por inversión cuidadosa del tubo, y colocándolos suavemente sobre papel absorbente. Como controles se utilizaron células sin ningún anticuerpo (blanco), células sin el primer anticuerpo, y un control de isotipo.

IV.5.- Determinación de actividades enzimáticas.

Para la determinación de la actividad de las enzimas Fosfatasa ácida y β -D glucuronidasa, las células fueron lavadas con PBS y posteriormente lisadas con Triton X-100 en una relación de 3×10^6 cels por cada mL de solución de Triton X-100 al 1%. En pozos de placas de 96 micropozos, se colocan 45 μ l del lisado celular por pozo. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Para la determinación de β -D Glucuronidasa se utilizaron 45 μ l del lisado, y se añadieron 90 μ L de amortiguador de acetatos (1) y 15 μ L de p-nitrofenil- β -D-glucurónido 0.01 M. Como blanco se utilizaron 45 μ L del amortiguador de lisis (Tritón 1%) por triplicado en lugar del lisado celular. Se incubó a 37 °C en baño María durante 2 h. La reacción se detuvo agregando 150 μ L de NaOH 0.2 M en cada uno de los pozos. Se leyó la densidad óptica a 405 nm en el lector de ELISA.

Para la determinación de fosfatasa ácida se utilizaron 25 μ l del lisado y como sustrato 100 μ l de una solución de p-nitrofenil disódico (4.5 mM). Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 90 min. La reacción se detuvo añadiendo 125 μ L de NaOH 2 N a cada uno de los pozos. Se determinó la densidad óptica a 405 nm en el lector de ELISA.

IV.6.- Fagocitosis mediada por receptores Fc γ :

a) Sensibilización de eritrocitos con DNP.

Los eritrocitos se conservaron en suspensión, en solución de Alsever estéril, a 4°C y protegidos de la luz, por un periodo máximo de 4 semanas. Para la sensibilización, se tomaron 15 mL de la suspensión de eritrocitos, se lavaron con 40 mL de DGVB⁺ estéril, centrifugándolos a 4000 RPM durante 12 min a 4°C, y retirando el sobrenadante. Los eritrocitos se resuspendieron descompactando el botón, y se repitió el procedimiento de lavado. Después del segundo lavado, el sobrenadante debe permanecer claro, de lo contrario, se procede a un tercer lavado, y si la hemólisis continúa, los eritrocitos deben ser

descartados.

Posteriormente, los eritrocitos se lavaron con 20 mL de DGVB⁺ y 20 mL de buffer de boratos, se observó el volumen de eritrocitos, y se decantó el sobrenadante. Se descompactó el botón de eritrocitos y se añadió una solución de TNBS en buffer de boratos (12.44 mg de TNBS en 7 mL de boratos por cada mL de botón de eritrocitos).

Los eritrocitos se incubaron en TNBS-boratos durante 10 min, en agitación suave y protegidos de la luz. Se diluyeron 1:2 con buffer de boratos y se centrifugaron a 4000 rpm a 4°C durante 12 min, se decantó el sobrenadante, se descompactó el botón y se lavaron con DGVB⁺.

b) Determinación del título de hemaglutinación.

Un mL de eritrocitos sensibilizados se lavaron con medio de cultivo RPMI sin complementar. Se descompactó el botón de eritrocitos y se resuspendieron al 2% en RPMI. Se hicieron diluciones sucesivas 1:2 de anticuerpos anti-DNP, en microplacas de 96 pozos de fondo en V, para tener un volumen final de 50 µL por pozo. Para hacer estas diluciones, se colocaron 100 µl de medio en los pozos a1 y b1. En los demás pozos de la filas a y b, se colocaron 50 µl de medio. Se calculó el volumen correspondiente de la solución de anticuerpo que contenga 20 µg de anticuerpo. Se retiró de los pozos a1 y b1 el volumen calculado y se sustituyó por el mismo volumen de la solución de anticuerpo. El anticuerpo se resuspendió y se retiraron 50 µl del pozo a1, colocándolos en el pozo a2. Se resuspendió y se pasaron 50 µl de la dilución al siguiente pozo a3. Se repitió el procedimiento haciendo diluciones sucesivas hasta el pozo a12. Se repitió con la fila b. Como control negativo se colocó una tercera fila de pozos conteniendo 50 µl de medio sin anticuerpos (fila c). Se añadieron 50 µl de la suspensión al 2% de eritrocitos sensibilizados con DNP a cada pozo, y la placa se incubó a temperatura ambiente en atmósfera húmeda durante una hora. Se observó el botón formado en los pozos, tomándose como título de hemaglutinación la concentración más baja de anticuerpos a la que aún se observa aglutinación visible.

c) Opsonización.

Se preparó una suspensión de eritrocitos sensibilizados al 1% en medio RPMI sin complementar, y se incubaron con anticuerpos anti-DNP a la concentración hemaglutinante, durante una hora, en agitación suave, a temperatura ambiente. Se eliminó el anticuerpo libre centrifugando los eritrocitos y retirando el sobrenadante. Se resuspendieron al 1% en RPMI. Los eritrocitos utilizados como control negativo se trataron bajo las mismas condiciones,

omitiendo solo la adición del anticuerpo.

d) Ensayos de fagocitosis:

Las células monocíticas se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 /mL en RPMI complementado. Se colocaron 320 μ l de la suspensión celular en tubos Eppendorf de 1.5 mL, por duplicado, y se agregaron 60 μ l de eritrocitos al 1% opsonizados con IgG anti-DNP. Como control negativo se usaron eritrocitos sin opsonizar, y como blanco, se usaron células sin eritrocitos. Los tubos se incubaron a 37° C en atmósfera con CO₂ al 5%, destapados, durante 90 min.

Se agregó 1 mL de solución hemolizante por tubo, se resuspendieron las células, y se centrifugaron en picofuga por 15 segundos. Se retiró el sobrenadante, se descompactó el botón, y se agregó 1 mL de solución hemolizante. Se centrifugaron en picofuga, y se retiró al máximo el sobrenadante.

Se agregaron 320 μ l de SDS al 0.3% en PBS. Se homogenizaron los lisados celulares, y se colocaron 100 μ l por pozo, por triplicado, en placas de 96 pozos para ELISA. Se añadieron 200 μ l de solución reveladora (DAB 0.4 mg/mL, H₂O₂ 0.36%) y se incubó a temperatura ambiente hasta desarrollo de color. Se midió la absorbancia a 490 nm.

IV.7.- Estimulación celular.

Las células se resuspendieron en RPMI complementado con 3% de SFB, a una concentración de 10×10^6 células/mL. Se colocó 1 mL de suspensión celular en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se mantuvieron en hielo durante 10 minutos previos al estímulo. Se añadieron 10 μ g de fragmentos Fab de anticuerpos anti-Fc γ RI o anti-Fc γ RII y se incubaron durante 10 min a 4°C. Se centrifugaron con un pulso en picofuga, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 mL de medio a 37°C conteniendo 50 μ g de fragmentos (Fab')₂ de anticuerpos anti-IgG de ratón, contando el tiempo de estimulación a partir de este momento. Los tubos se colocaron a 37°C. La estimulación se detuvo colocando los tubos en hielo y añadiendo 0.5 mL de TBS frío, se centrifugaron con un pulso en picofuga y se retiró al máximo el sobrenadante.

Después de la estimulación, se añadieron a cada tubo conteniendo el botón celular, 0.5 mL de amortiguador de lisis conteniendo Tritón X-100 al 1% con inhibidores de proteasas y fosfatasa, y se incubaron a 4°C durante 15 min. Se centrifugaron a 15000 rpm durante 15 min. a 4°C, y se transfirió recuperó el sobrenadante.

1V.8.- Inmunoprecipitación e Inmunoblot anti-fosfotirosina

Previo a la estimulación se colocaron 10 μ l de agarosa-Proteína A en tubos de 1.5 mL, se lavaron con amortiguador de lavados, y se incubaron con 1.5 μ g de anticuerpos anti-fosfotirosina y 60 μ l de amortiguador de lavados durante 3 hrs a 4°C. Se retiraron los anticuerpos no unidos a las perlas lavándolas 3 veces con 1 mL de amortiguador de lavados, y se incubaron las perlas con el lisado celular clarificado, durante 3 hrs a 4°C en agitación suave. Las perlas se lavaron 4 veces con 1 mL de amortiguador de lavados, y se añadieron 25 μ l de amortiguador de Laemmli 4X reductor a cada muestra. Se hirvieron durante 5 minutos.

Las proteínas inmunoprecipitadas se separaron mediante SDS-PAGE, en gel de poliacrilamida al 10%, a 150 volts. Después de la electroforesis, el gel se ambientó en amortiguador de transferencia y las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia, en cámara semiseca (Biorad). Se bloquearon los sitios libres de la membrana, incubándola toda la noche en una solución de 3% de leche descremada (Carnation) y 1% de BSA, en TBS con Tween-20 (Sigma) al 0.05%. Se lavó la membrana durante 15 minutos en TBS-Tween y se bloqueó con BSA 1% en TBS-Tween durante una hora. Se lavó con TBS-Tween, una vez durante 15 minutos y dos veces por 5 minutos. La membrana se incubó 90 minutos con anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina acoplado a peroxidasa (PY-20-HRP, Santa Cruz) diluido 1:3000 en TBS-Tween con BSA 1%. La membrana se lavó una vez 15 minutos, y cuatro veces 5 minutos con TBS-Tween. Se reveló utilizando un kit de quimioluminiscencia aumentada, siguiendo las instrucciones del fabricante (PIERCE).

a) Elusión de los anticuerpos de la membrana de nitrocelulosa e inmunoblot anti-proteína específica

Después del revelado con quimioluminiscencia, el blot se lavó 4 veces durante 5 min en TBS-Tween. Se incubó con amortiguador de elusión durante 30 min a 60°C, y se lavó tres veces con TBS-Tween 5 minutos cada lavado. Se bloqueó de nuevo la membrana, incubándola toda la noche en 1% de BSA, en TBS con Tween-20 (Sigma) al 0.05%, y se lavó tres veces durante 5 minutos en TBS-Tween. Se incubó 90 minutos con 15 mL de anticuerpo anti-proteína, diluido 1:3000 en TBS-Tween con BSA 1%.

Se lavó tres veces durante 5 minutos, y se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a HRP, protegido de la luz, durante 60 min. Se lavó con TBS-Tween 4 veces durante 5 min. Se reveló utilizando un kit de quimioluminiscencia aumentada, siguiendo las instrucciones del

fabricante (PIERCE). Los blots anti-actina se incubaron durante 1 hora en 4 mL de anticuerpo anti-actina (C-11, Cs-1615 Santa Cruz) diluido en BSA al 1% en TBS-Tween, en una bolsa de plástico sellada. Se lavaron tres veces con TBS-Tween y se incubaron con anticuerpo anti-cabra (Sc-2033 Santa Cruz) diluido 1:500 en 15 mL de BSA 1% en TBS-Tween.

La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría utilizando el equipo Gel-Doc (Bio-Rad) y el software Quantity One (Bio-Rad).

V. RESULTADOS

Para abordar experimentalmente el estudio comparativo de la señalización mediada por receptores para IgG (Fc γ Rs) en células monocíticas en diferentes estadios de diferenciación fue necesario, por un lado, estandarizar las condiciones para detectar la fosforilación de proteínas celulares después de la estimulación de las células monocíticas a través de los Fc γ Rs, y por otro lado, obtener poblaciones homogéneas de células monocíticas en diferentes estados de diferenciación. Una vez que se contó con estas herramientas se procedió a analizar semi-cuantitativamente la fosforilación y activación de las cinasas Lyn y Syk inducida por la agregación de los receptores Fc γ RI y Fc γ RII en células en distintos estadios de diferenciación. De acuerdo con esto, los resultados se presentan en tres secciones:

- 1.- Estandarización de las condiciones para el análisis de la fosforilación de proteínas en células monocíticas.
- 2.- Inducción de diferenciación *in vitro* de células monocíticas de las líneas U-937 y THP-1.
- 3.- Análisis de la activación de las cinasas Syk y Lyn en células monocíticas en distintos estadios de diferenciación.

V.1.- Estandarización de las condiciones para el análisis de la fosforilación en tirosina.

Para detectar la expresión de Fc γ Rs sobre las células U937 y THP-1 utilizamos anticuerpos monoclonales murinos de la clase IgG específicos para los Fc γ RI (mAb 32.2), Fc γ RII (mAb IV.3) o Fc γ RIII (mAb 3G8). Los anticuerpos 32.3 y IV.3 fueron purificados en el laboratorio por cromatografía de afinidad en columnas de Proteína G o Proteína A acopladas a agarosa, a partir de sobrenadantes de hibridomas obtenidos de la ATCC y el mAb 3G8 se obtuvo comercialmente. La unión de los anticuerpos a la membrana de las células U-937 y THP-1 se corroboró por medio de inmunofluorescencia indirecta y citofluorometría.

Observamos que los anticuerpos anti-Fc γ RI (32.2) y anti-Fc γ RII (IV.3) se unen a las células, mientras que los anti-Fc γ RIII (3G8) no mostraron unión específica. Estos resultados nos permitieron corroborar que las células monocíticas U937 y THP-1 expresan receptores Fc γ RI y Fc γ RII y no expresan de manera constitutiva el receptor Fc γ RIII.

Se ha reportado que el entrecruzamiento de Fc γ Rs induce la fosforilación de proteínas en células monocíticas de las líneas U-937 y THP-1 (Liao, F., et al, 1992; School,

P.R., 1992. Rankin, B.M., et al, 1993). Para inducir la agregación de los receptores Fc γ RI y Fc γ RII, las células U-937 se incubaron con los anticuerpos monoclonales específicos para cada receptor por 20 min a 4°C. Después de lavar, se indujo el entrecruzamiento añadiendo un segundo anticuerpo dirigido contra IgG de ratón (G α M). La fosforilación de proteínas en residuos de tirosina se detectó analizando los lisados totales de las células estimuladas por medio de inmunoblot anti-fosfotirosina.

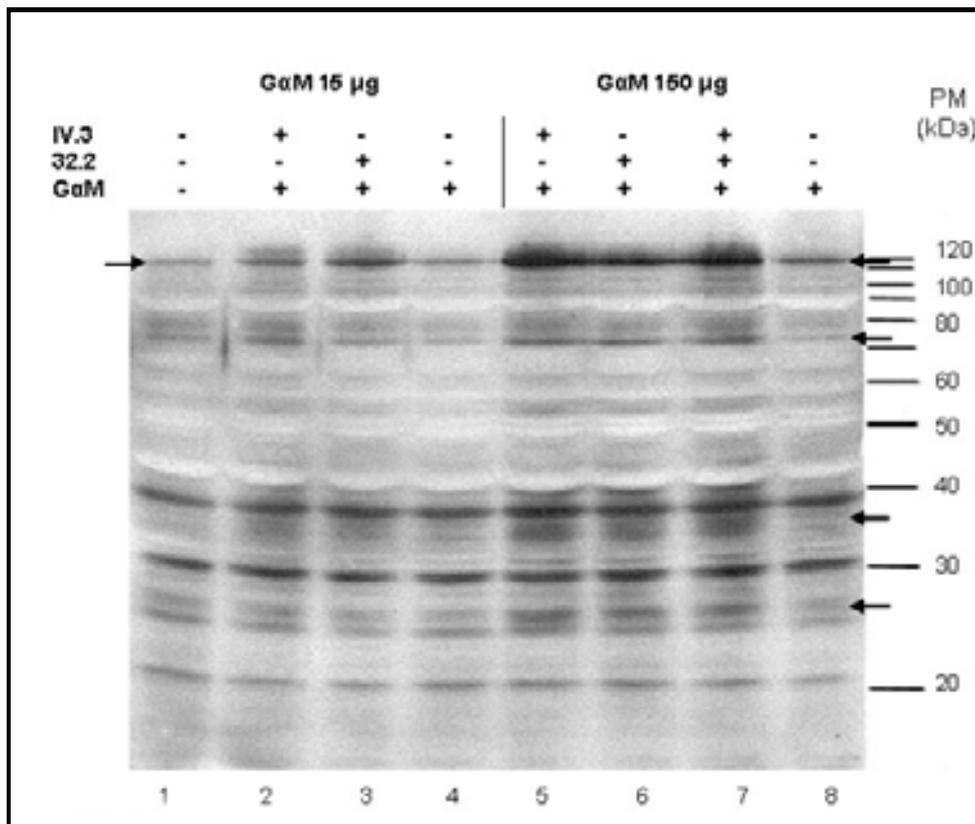


Fig. 4 Fosforilación en tirosina inducida por estimulación celular a través de los Fc γ RI y Fc γ RII. 1.5×10^6 células U-937 se estimularon con 10 μ g de anticuerpos anti-receptor (IV.3 o 32.3) más 15 μ g (carriles 1-4) o 150 μ g (carriles 5-8) del segundo anticuerpo (G α M). Los controles corresponden a células sin ningún estímulo (carril 1) o células sin anticuerpos anti-receptor pero con segundo anticuerpo (carriles 4 y 8). Los lisados celulares se analizaron por western blot anti-fosfotirosina, y las flechas en la imagen señalan las bandas detectadas en respuesta al estímulo.

Como se observa en la Figura 4 (carriles 1-4), usando 15 μ g de anticuerpo secundario solo logramos detectar la fosforilación específica de una banda alrededor de 120 kDa. Al aumentar 10 veces la concentración del segundo anticuerpo detectamos bandas fosforiladas de 120, 72, 36 y 27 kDa (Fig. 4 carriles 5-7, flechas). En el carril 8 se muestra que el

segundo anticuerpo por sí solo no induce fosforilación específica de proteínas aún en concentraciones elevadas, por lo que la fosforilación de las bandas detectadas es dependiente de los anticuerpos específicos anti-Fc γ R. No se observan diferencias al comparar las bandas que se fosforilan por la estimulación a través del Fc γ RII (carril 5), del Fc γ RI (carril 6) o cuando co-agregamos ambos receptores (carril 7).

Cuando se utilizan lisados totales separados por SDS-PAGE para detectar cambios en el estado de fosforilación de proteínas celulares, detectamos muy pocas bandas fosforiladas de manera específica como resultado de la agregación de receptores. Hay además un número significativo de bandas que aparecen fosforiladas en el control negativo cuya fosforilación es independiente de la agregación de los receptores Fc γ (carriles 1, 4 y 8). Por tanto, decidimos realizar una inmunoprecipitación anti-fosfotirosina antes de la separación por SDS-PAGE e inmunoblot, ya que esto nos permitiría una mayor sensibilidad.

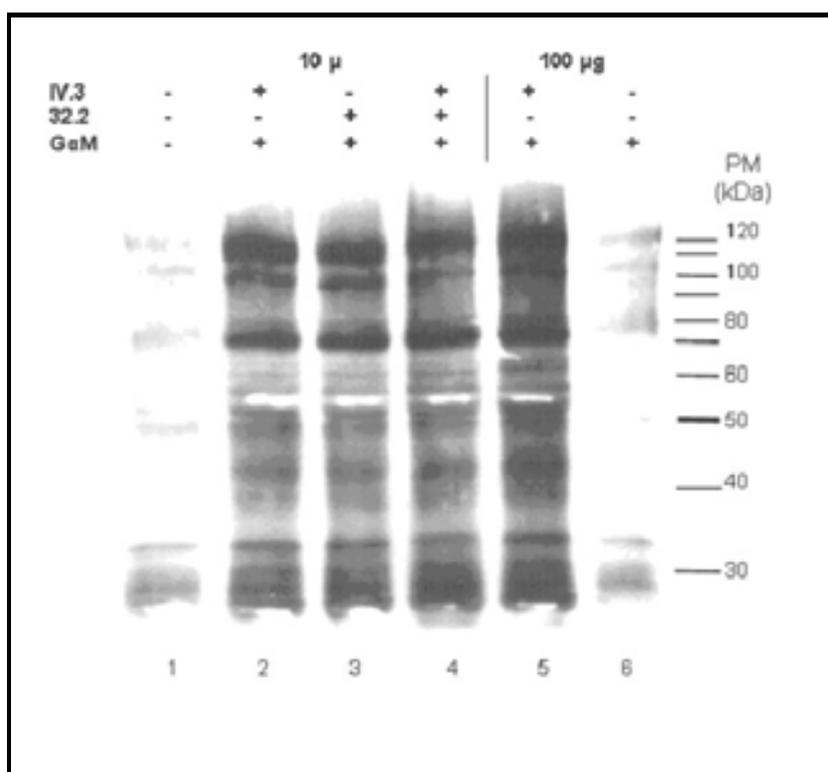


Fig. 5 Inmunoprecipitación de proteínas fosforiladas en tirosin. 10×10^6 células U-937 se estimularon con 10 μ g (carriles 2-4) o con 100 μ g (carril 5) de anticuerpos anti-receptor agregándolos con 150 μ g de segundo anticuerpo (GaM). Después de la estimulación las células se lisaron, las proteínas fosforiladas se inmunoprecipitaron y se detectaron por inmunoblot. Los controles corresponden a células sin ningún estímulo (carril 1) y células sin anticuerpos anti-receptor pero con segundo anticuerpo (carril 6).

Para inmunoprecipitar las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina, las células se estimularon entrecruzando los receptores $Fc\gamma$, se lisaron, y los lisados celulares se incubaron con anticuerpos anti-fosfotirosina unidos a proteína G-agarosa. Las proteínas inmunoprecipitadas se separaron por SDS-PAGE y se analizaron mediante inmunoblot anti-fosfotirosina. En la figura 5 se muestran los resultados de células estimuladas a través de los receptores $Fc\gamma$ RI (carril 2), $Fc\gamma$ RII (carril 3), o co-agregando ambos receptores (carril 4). Se detectaron bandas fosforiladas con pesos moleculares aparentes de 120, 100, 72, 60, 55, 50, 45, 40, 35 y 25 kDa, tanto al agregar con 10 μ g como con 100 μ g del segundo anticuerpo. Al comparar el patrón de fosforilación inducido por los dos receptores no se detectan diferencias en las bandas fosforiladas cuando se estimula a través del $Fc\gamma$ RII, del $Fc\gamma$ RI o de ambos a la vez (carriles 2-4). De los resultados detallados hasta aquí, determinamos que 10 μ g de anticuerpo anti-receptor son suficientes para inducir una fuerte estimulación, la cual no aumenta significativamente al utilizar cantidades 10 veces mayores de anticuerpo (carriles 2 y 5). La fosforilación detectada es dependiente del anticuerpo anti-receptor, pues el segundo anticuerpo por sí solo no induce fosforilación específica (carril 6). Resultados similares se obtuvieron en al menos 3 experimentos independientes.

Los anticuerpos anti- $Fc\gamma$ R utilizados para la estimulación reconocen a los receptores $Fc\gamma$ a través de sus sitios de unión al antígeno ó porciones Fab, pero al ser de clase IgG podrían unirse a los $Fc\gamma$ R también por la porción Fc. Este podría ser el motivo por el cual no encontramos diferencias al estimular con los anticuerpos dirigidos contra uno u otro receptor, pues si se unieran también por su porción Fc, tanto el anticuerpo anti- $Fc\gamma$ RI como el anti- $Fc\gamma$ RII estimularían a ambos receptores y siempre estaríamos co-agregándolos, observándose las mismas bandas en los tres casos. Para evitar la unión de los anticuerpos por la porción Fc y asegurar una estimulación específica, se produjeron fragmentos Fab de ambos anticuerpos antireceptor. Los fragmentos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, visualizándolos por tinción con Azul de Coomassie en condiciones reductoras y no reductoras. Como resultado de la digestión de los anticuerpos IV.3 detectamos dos bandas de aprox. 30 y 25 kDa en condiciones reductoras (Figura 6, carriles 1 y 3) y una banda de 55 kDa en condiciones no reductoras (carril 4), que corresponden a los pesos característicos de los fragmentos Fab'. Para comprobar la pureza de los fragmentos, estos fueron biotinilados y analizados por western blot revelando con estreptoavidina acoplada a peroxidasa, utilizando el sistema de quimioluminiscencia aumentada.

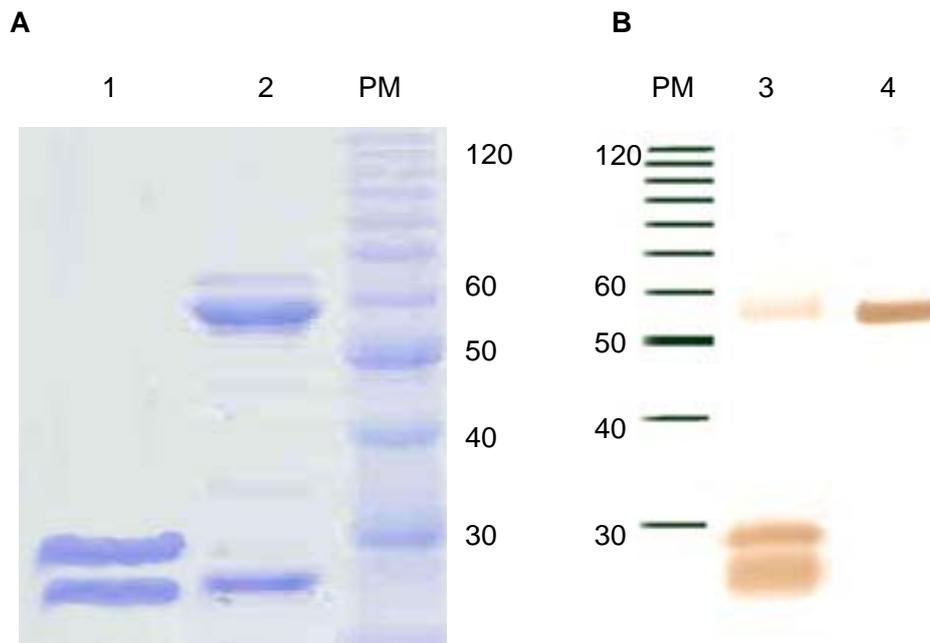


Fig. 6 Fragmentos Fab' de anticuerpos anti-Fc γ R producidos por digestión enzimática. Los anticuerpos IV.3 fueron fragmentados con pepsina inmobilizada, separados en SDS-PAGE y teñidos con azul de Coomassie (A). Se biotinilaron, se separaron en SDS-PAGE, se transfirieron a nitrocelulosa y se detectaron mediante el sistema estreptoavidina biotina (B). Carriles 1 y 2: Fragmentos Fab' y anticuerpo IV.3 completo, en condiciones reductoras. Carriles 3 y 4: fragmentos Fab' biotinilados, en condiciones reductoras (carril 3) y no reductoras (carril 4).

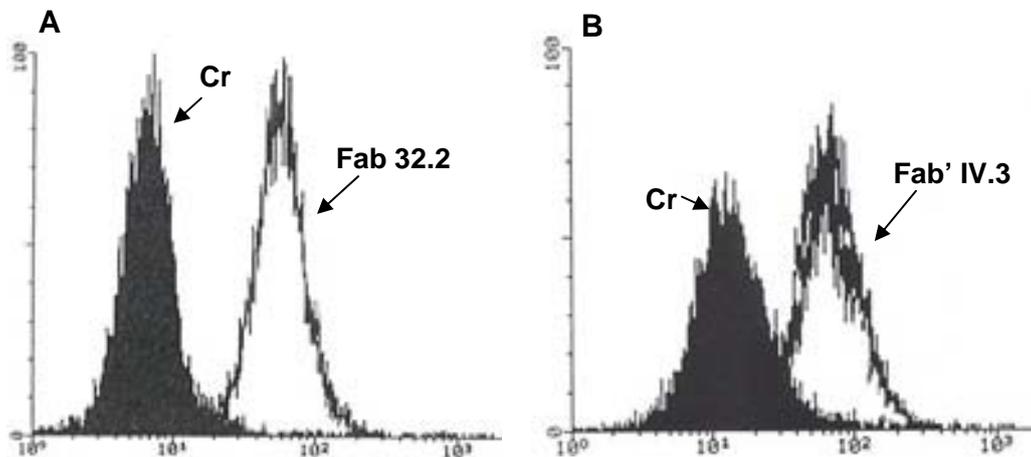


Fig. 7 Unión de los fragmentos de anticuerpos anti-Fc γ R producidos por digestión enzimática, a células U-937. 1×10^6 células U-937 se incubaron con los fragmentos de los anticuerpos anti-receptor y posteriormente con un segundo anticuerpo acoplado a FITC. Como control utilizamos células incubadas solo con el segundo anticuerpo. Los resultados se analizaron por citometría de flujo.

En la figura 6, carril 3 se muestran los fragmentos IV.3 Fab' biotinilados en condiciones reductoras, observándose únicamente las bandas de 30 y 25 kDa. La banda de 55 kDa que se observa en el carril 4 corresponde a fragmentos Fab' no reducidos. Este resultado demuestra la pureza de los fragmentos, ya que no se detectan anticuerpos completos ni otros contaminantes aún con la alta sensibilidad de este método. El análisis de la digestión de los anticuerpos 32.2 reveló dos bandas de pesos moleculares Fab (25 kDa en condiciones reductoras y una de 50 kDa en condiciones no reductoras) característicos de los fragmentos.

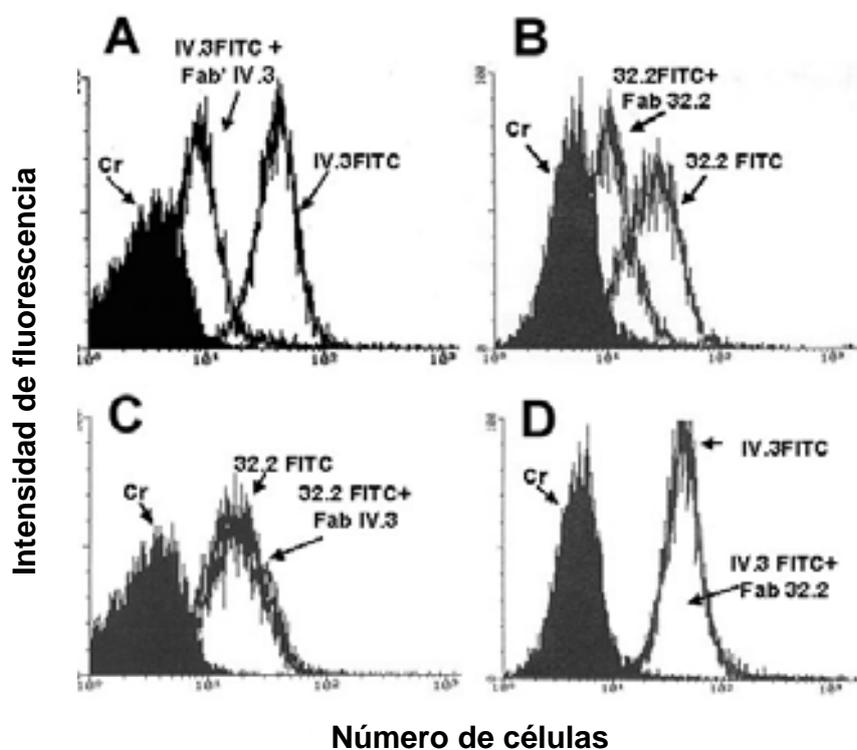


Fig. 8 Especificidad de unión de los fragmentos de anticuerpos anti-receptor. 1×10^6 células se incubaron con anticuerpos anti-receptor acoplados a FITC, en presencia o ausencia de los fragmentos Fab. Los resultados se analizaron por citometría de flujo.

Las condiciones de la digestión y purificación de los anticuerpos para obtener los fragmentos, tales como pH bajo, altas concentraciones de sales, variaciones en la temperatura, etc. pueden dañar la estructura de las proteínas, en este caso disminuyendo o eliminando la reactividad de los anticuerpos. Para comprobar que los fragmentos Fab y Fab' obtenidos conservan sus características nativas de reconocimiento antigénico analizamos su unión a las células monocíticas mediante inmunofluorescencia indirecta y análisis por FACS

(Fig. 7). Los histogramas muestran que los fragmentos Fab 32.2 (A) y Fab' IV.3 (B) conservan su capacidad de unirse a las células.

La especificidad de unión de cada anticuerpo se demostró por estudios de competencia entre los fragmentos producidos y anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) obtenidos comercialmente. Como podemos observar en la Figura 8, los fragmentos obtenidos del anticuerpo IV.3 (Fab' IV.3) bloquean la unión del mismo anticuerpo (IV.3 FITC) (Fig. 8A), pero no bloquean la unión del anticuerpo 32.2 (32.2 FITC) (Fig. 8C), mientras que los fragmentos 32.2 (Fab 32.2) bloquean la unión del anticuerpo 32.2 (Fig. 8B), pero no bloquean la unión del anticuerpo anti-Fc γ RII (IV.3 FITC) (Fig. 8D).

Posteriormente, los fragmentos anti-receptor se utilizaron para estimular células U-937 y THP-1, y se analizó el patrón de fosforilación inducido por los fragmentos anti receptor y compararlos con el patrón inducido por los anticuerpos completos. La estimulación se llevó a cabo permitiendo a los fragmentos o al anticuerpo intacto unirse a las células a 4°C, e induciendo la agregación al entrecruzar los fragmentos del anticuerpo anti-receptor con fragmentos F(ab')₂ de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón. Se probaron diferentes cantidades de fragmentos F(ab')₂ para determinar la cantidad saturante. Como se observa en la Fig. 9, al estimular con los fragmentos del anticuerpo IV.3 obtuvimos patrones de fosforilación en tirosina similares a los que se obtienen al estimular con los anticuerpos completos tanto en células U-937 como en células THP-1 (comparar los carriles 2 y 3 en Fig. 9A y los carriles 5 y 6 en Fig. 9B). También concluimos que 50 μ g de fragmentos entrecruzantes F(ab')₂ son suficientes para inducir un alto grado de estimulación bajo nuestras condiciones experimentales.

Para determinar el tiempo óptimo de estimulación de la fosforilación en tirosina inducida a través de los receptores Fc γ RI y II hicimos una cinética de estimulación. Las células se estimularon con fragmentos anti-Fc γ RI o anti-Fc γ RII deteniendo la estimulación a diferentes tiempos, se inmunoprecipitaron las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina y se analizaron mediante inmunoblot anti-fosfotirosina. El nivel máximo de fosforilación se observó a los tres minutos, tanto en la estimulación a través del Fc γ RI como del Fc γ RII (Fig. 10).

Con base en los resultados mostrados, elegimos como condiciones de estimulación las descritas en materiales y métodos.

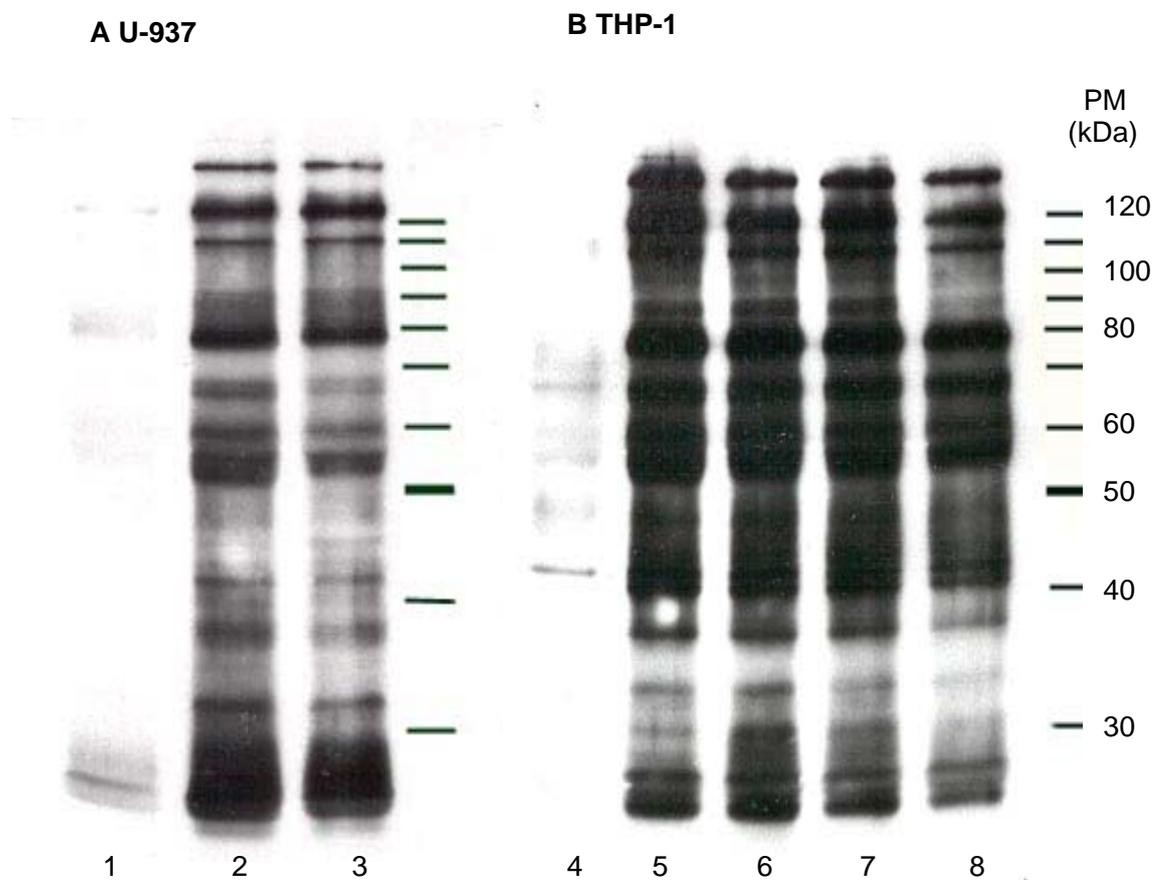


Fig. 9 Estimulación celular a través del $Fc\gamma RII$. 10×10^6 células U-937 (A) o THP-1 (B) se estimularon durante 3 min. Con $10 \mu\text{g}$ de anticuerpos anti-receptor $Fc\gamma RII$ (IV.3) o con sus fragmentos Fab. Los anticuerpos se entrecruzaron con un segundo anticuerpo (carriles 2 y 5) y los fragmentos se entrecruzaron con fragmentos comerciales $F(ab')_2$ usando diferentes cantidades (carril 6 $150 \mu\text{g}$, carril 7 $80 \mu\text{g}$ y carriles 3 y 8 $50 \mu\text{g}$). Las células se lisaron, se inmunoprecipitaron las proteínas fosforiladas en tirosina y se analizaron mediante western-blot anti fosfotirosina.

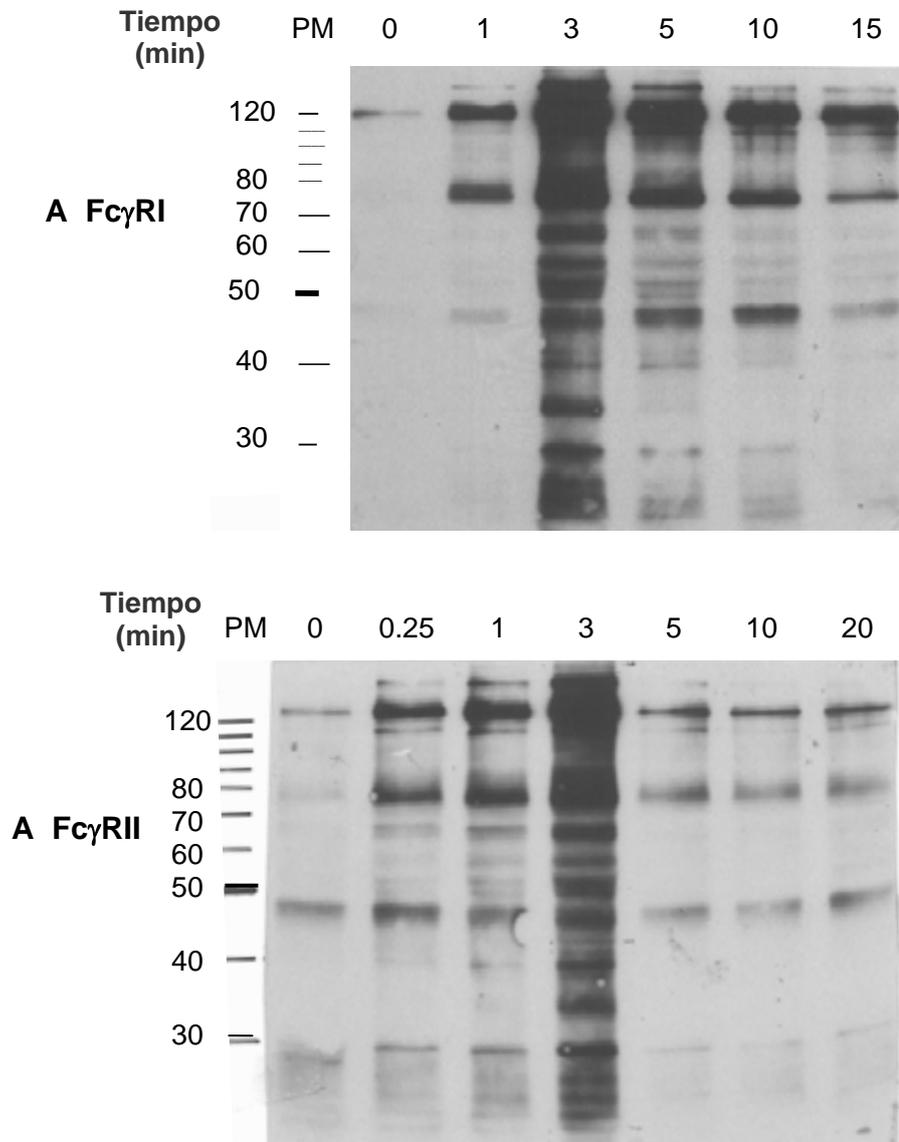


Fig. 10 Cinética de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina inducida por la agregación de los Fc γ RI (A) y Fc γ RII (B) en células U-937. 10×10^6 células U-937 se estimularon por diferentes tiempos con fragmentos de anticuerpo anti-receptor Fc γ RI (A) o Fc γ RII (B) entrecruzados con fragmentos F(ab')₂ de un anticuerpo secundario. Las células se lisaron, se inmunoprecipitaron las proteínas fosforiladas en tirosina y se analizaron mediante western-blot anti fosfotirosina.

V.2.- Inducción de diferenciación de células monocíticas U-937 y THP-1

Los monocitos son leucocitos circulantes que, después de la migración a los tejidos, maduran a macrófagos. Durante los procesos de maduración, las células monocíticas llevan a cabo una serie de cambios fenotípicos que dan lugar al incremento de algunas funciones y la disminución de otras (Auger M.J. y Ross, J.A.1992). Las líneas de células monocíticas, entre ellas las U-937, y THP-1, pueden ser diferenciadas *in vitro* por diversos agentes como dimetil sulfóxido (DMSO), ácido retinoico (RA), 1 α ,25-dihidroxi-vitamina D3 (VD3), interferón γ (IFN γ) y forbol miristato acetato (PMA), entre otros. Estos procesos de diferenciación se caracterizan por cambios morfológicos, aumento o disminución en la expresión de algunas moléculas de superficie, diferencias en su capacidad de realizar algunas funciones efectoras, disminución en la tasa de proliferación celular, etc.

Sin embargo, a pesar de que es claro que a partir de una línea celular se pueden obtener células monocíticas diferenciadas, existe una gran heterogeneidad en los diversos reportes científicos con respecto a las condiciones de tratamiento (concentraciones del agente y tiempo de tratamiento) (Boltz-Nitulescu G., et. al. 1995; Feuerstein N. and Cooper HL1984; Taimi M., et. al. 1990; Denholm E.M. and Stankus G.P. 1995; Matikainen S. and Hurme M. 1994; Schwende H., et.al. 1996). Por lo tanto, para este trabajo fue necesario primero establecer condiciones de tratamiento de las líneas U937 y THP-1 que nos permitieran obtener poblaciones celulares homogéneas, en diferentes estados de diferenciación.

Utilizamos distintos agentes que han sido reportados como inductores de diferenciación de células monocíticas *in vitro* (PMA, VD3, RA, IFN γ) y analizamos su efecto en las dos líneas celulares monocíticas (THP-1 y U-937) analizando los siguientes parámetros:

- 1.- Cambios morfológicos: Mediante la observación microscópica.
- 2.- Adhesión celular: Mediante el conteo en hematocitómetro de las células en suspensión y de las células adheridas a la caja de cultivo.
- 3.- Viabilidad: Mediante la incorporación de azul tripano en las células.
- 4.- Proliferación: Mediante el conteo celular en hematocitómetro comparando el número total en células sin tratar y tratadas, y con ensayos de reducción de MTT.
- 5.- Expresión de moléculas de superficie: Se analizó la variación en la expresión de los receptores CR3, CD14, receptores Fc γ tipo I y II, así como también la posible inducción del Fc γ R III, mediante análisis por citofluorometría de flujo.

6.- Actividad de enzimas intracelulares: Se determinó la actividad de las enzimas β -D glucuronidasa y fosfatasa ácida mediante ensayos de hidrólisis de su sustrato.

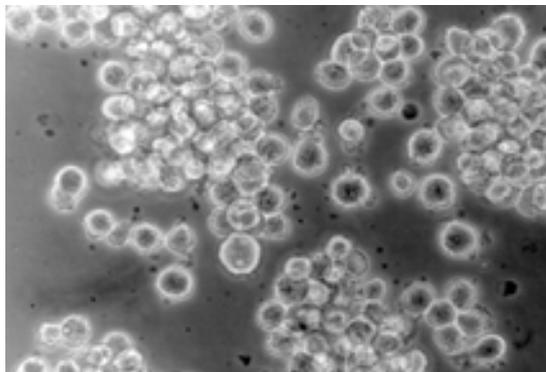
7.- Fagocitosis: Se determinó por el método de Jungi, que se basa en la actividad de pseudoperoxidasa que presenta la hemoglobina. Se induce una reacción colorida que puede ser cuantificada espectrofotométricamente.

V.2.1 Cambios en la morfología celular inducidos por los agentes inductores de diferenciación, en células monocíticas U-937 y THP-1

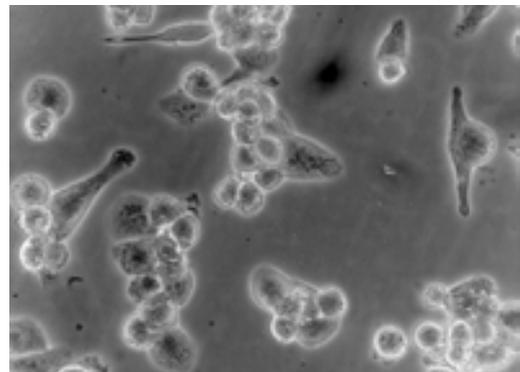
Inicialmente, las células se trataron con diferentes concentraciones de PMA, en un rango de 10 a 100 nM, y se evaluó el efecto cada 24 horas analizando la viabilidad, morfología, adhesión y proliferación celular. La concentración óptima de PMA fue 50 nM, ya que con esta concentración pudimos observar un notable cambio en la morfología: las células, que normalmente crecen en suspensión, se adhirieron al plástico y se extendieron adquiriendo morfología de macrófagos. También hubo una disminución considerable en la tasa de proliferación celular y no se afectó la viabilidad de manera importante.

La VD3 se utilizó a concentraciones de 100 nM y 1000 nM, observándose muerte celular significativa a la concentración más alta. Con la concentración de 100 nM se observaron efectos desde las 24 horas que se fueron acentuando a tiempos más largos (hasta las 72 horas). A las 96 horas de tratamiento, hubo una disminución en la viabilidad celular, por lo que se decidió no tratar a las células con VD3 por tiempos mayores a 72 horas. El ácido retinoico (RA) se utilizó a las concentraciones de 1 y 10 μ M. A 10 μ M se observó una alta granularidad en el interior de las células y una alta proporción de células muertas. A 1 μ M se observaron cambios ligeros en la morfología y en la proliferación celular en ambas líneas celulares, sin disminución de la viabilidad. Finalmente, el tratamiento con IFN γ no indujo cambios en los parámetros analizados.

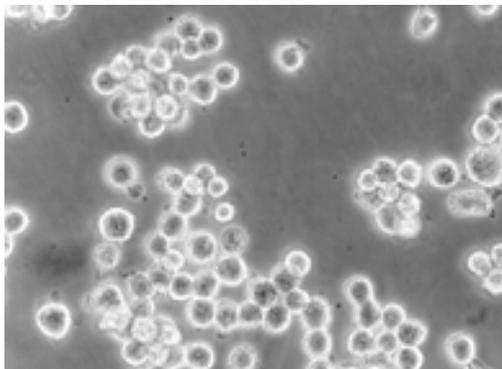
Las figuras 11 A-D ilustran la morfología observada en las células THP-1, y las figuras 11E-F en las células U-937. Tanto en las células THP-1 como en las U-937 el PMA y la VD3 indujeron cambios morfológicos notables, mientras que con RA e IFN γ no se indujeron cambios evidentes.



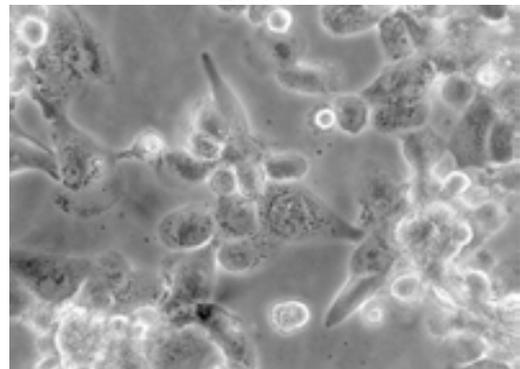
CONTROL
24 Hrs



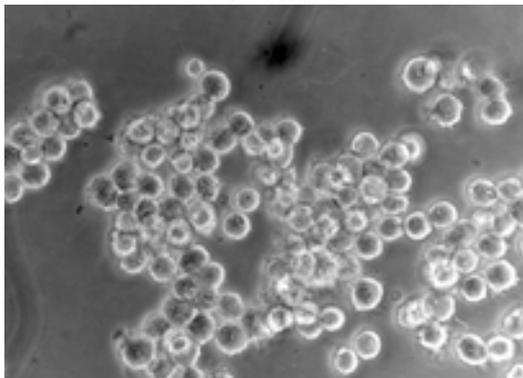
PMA
24 Hrs



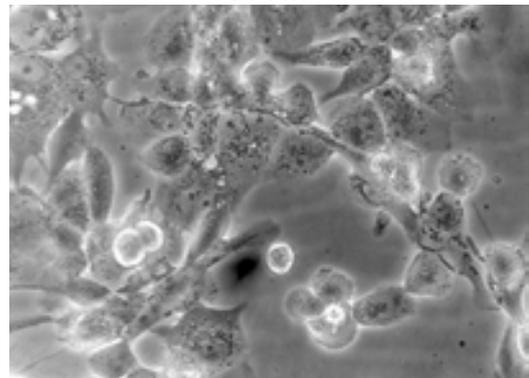
CONTROL
48 Hrs



PMA
48 Hrs



CONTROL
72 Hrs



PMA
72 Hrs

Fig. 11A Efecto del PMA sobre la morfología de células de la línea THP-1: 1×10^6 células se sembraron en RPMI con PMA 50 nM y se incubaron a 37°C por diferentes tiempos.

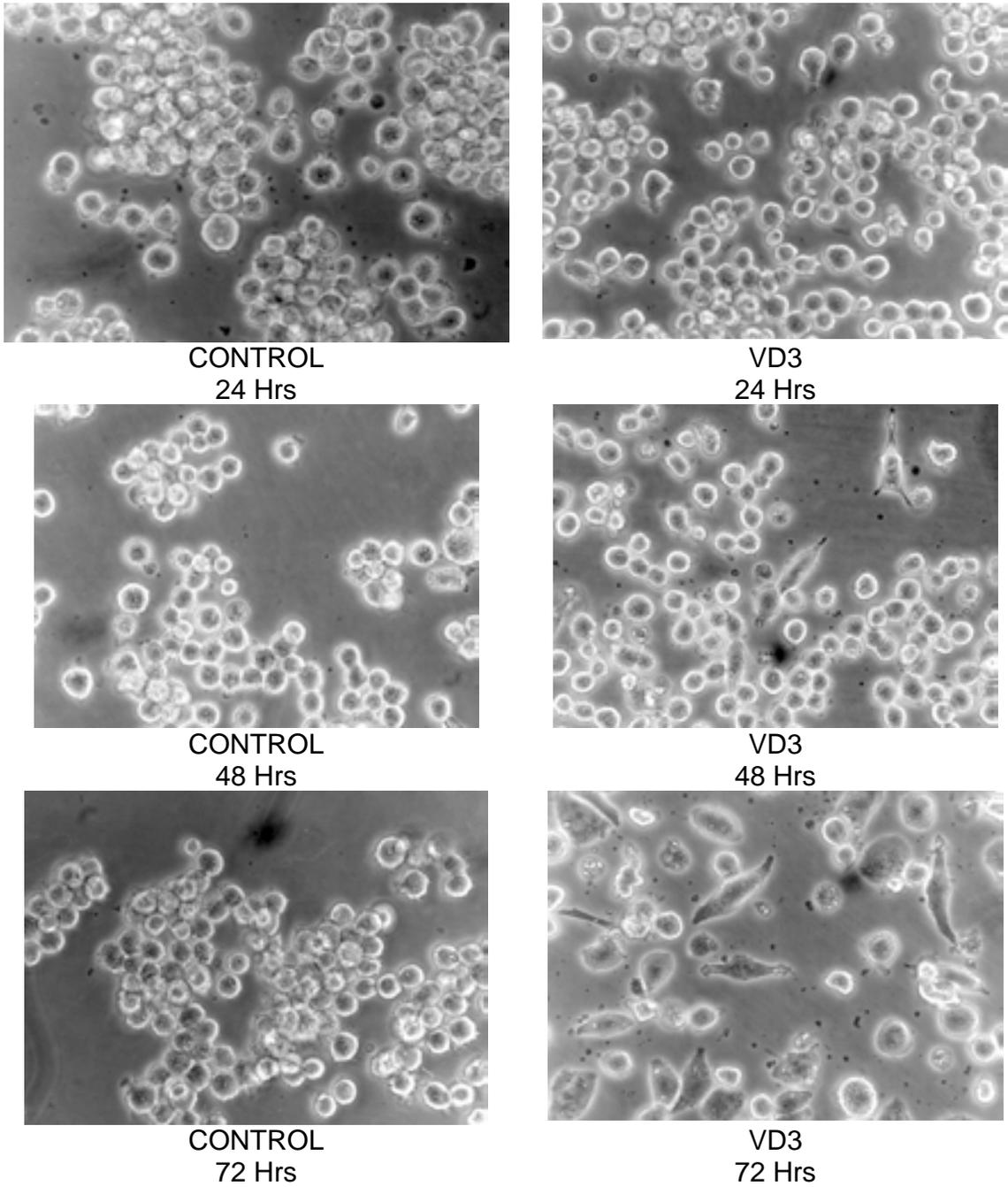
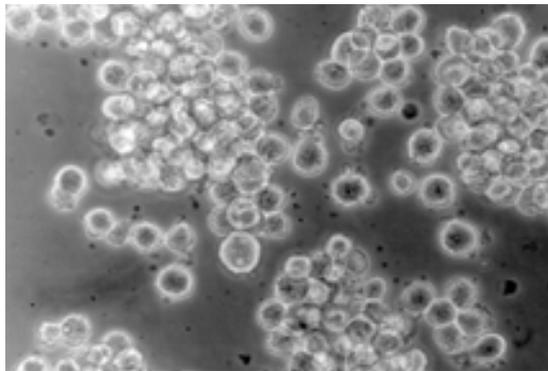
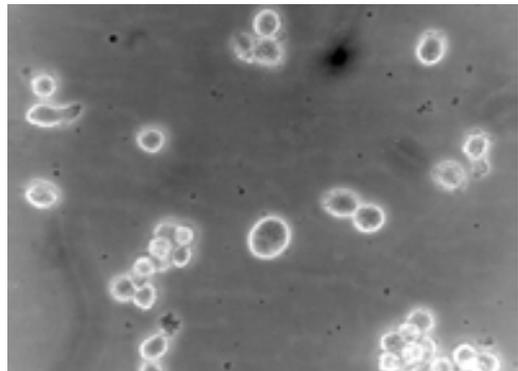


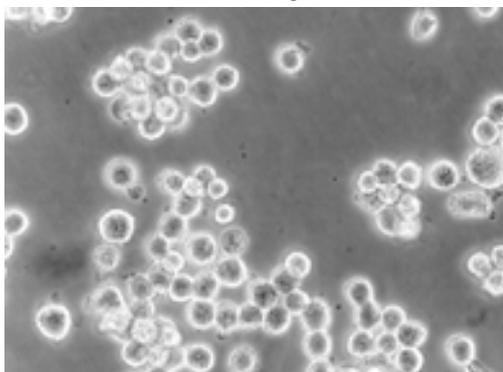
Fig. 11B Efecto de la VD3 sobre la morfología de células de la línea THP-1: 1×10^6 células se sembraron en RPMI con VD3 100 nM y se incubaron a 37°C por diferentes tiempos.



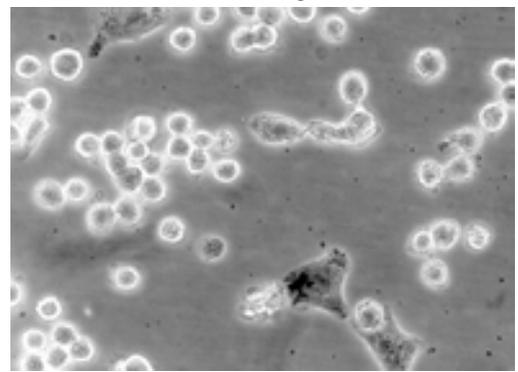
CONTROL
24 Hrs



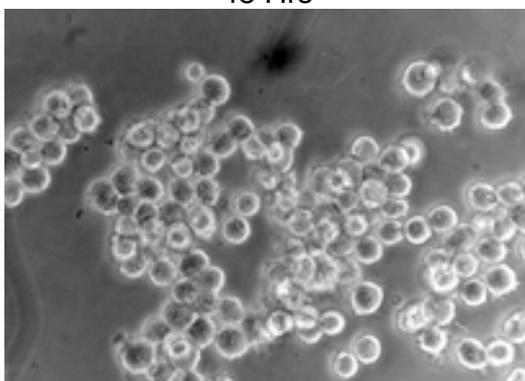
RA
24 Hrs



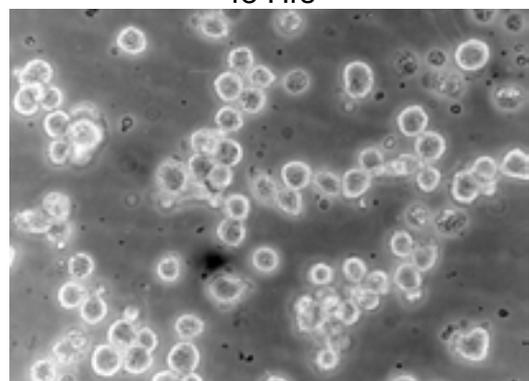
CONTROL
48 Hrs



RA
48 Hrs

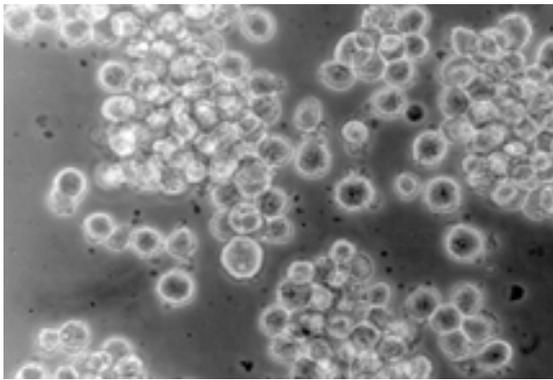


CONTROL
72 Hrs

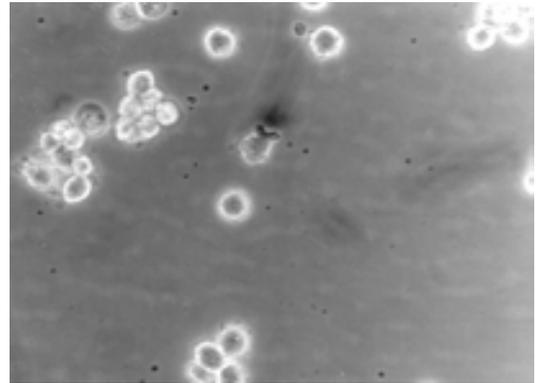


RA
72 Hrs

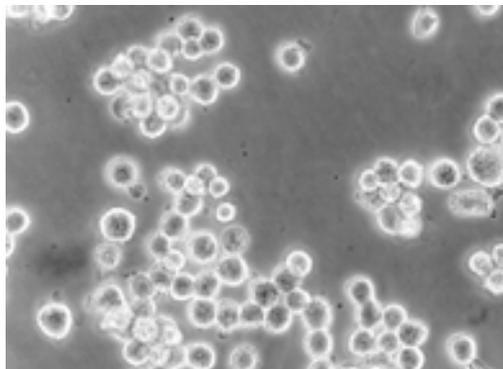
Fig. 11C Efecto del RA sobre la morfología de células de la línea THP-1. 1×10^6 células se sembraron en RPMI con RA $1 \mu\text{M}$ y se incubaron a 37°C por diferentes tiempos.



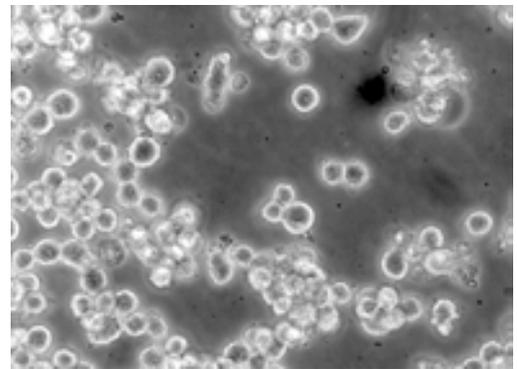
CONTROL
24 Hrs



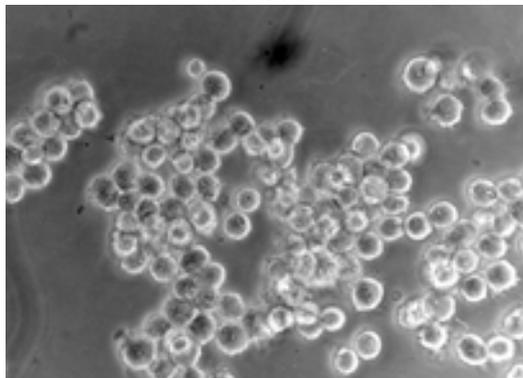
IFN γ
24 Hrs



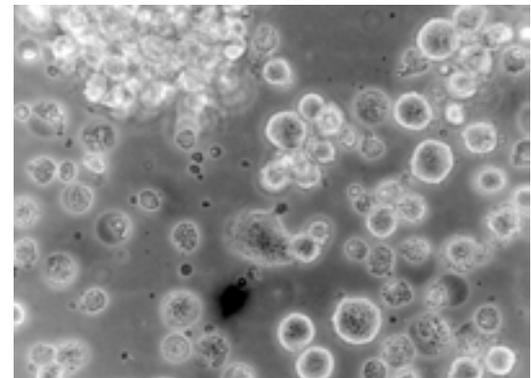
CONTROL
48 Hrs



IFN γ
48 Hrs



CONTROL
72 Hrs



IFN γ
72 Hrs

Fig. 11D Efecto del IFN γ sobre la morfología de células de la línea THP-1: 1×10^6 células se sembraron en RPMI con IFN γ 100 U/ml y se incubaron a 37°C por diferentes tiempos.

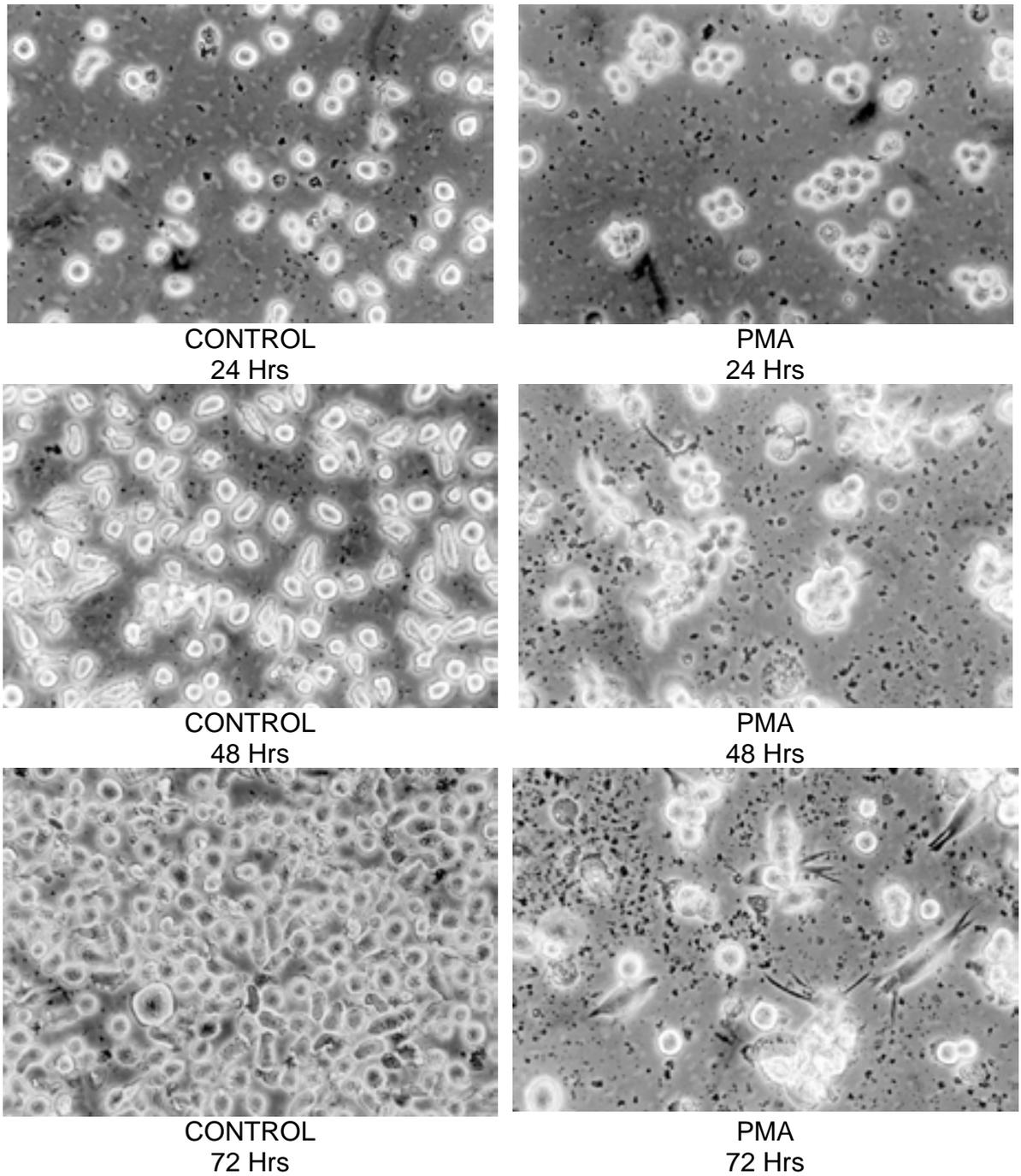


Fig. 11E Efecto del PMA sobre la morfología de células de la línea U-937. 1×10^6 células se sembraron en RPMI con PMA 50 nM y se incubaron a 37°C por diferentes tiempos.

Control



VD3

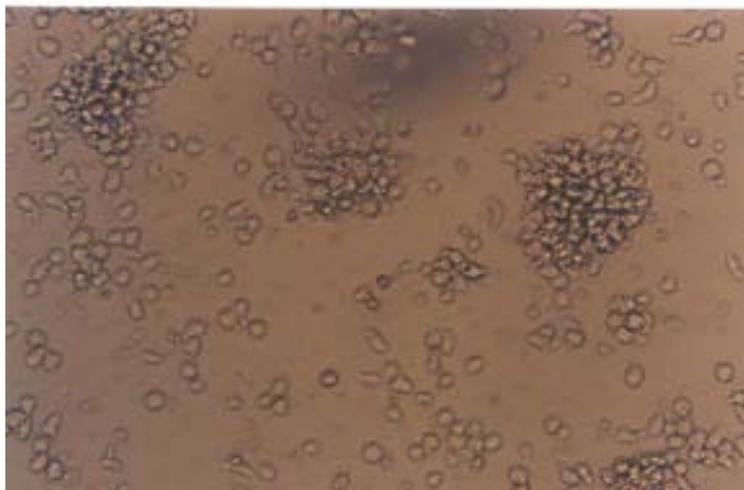


Fig. 11F Efecto de la VD3 sobre la morfología de células de la línea U-937. 1×10^6 células se sembraron en RPMI con VD3 100 nM y se incubaron a 37°C por 72 horas.

V.2.2 Cambios en la proliferación celular causados por los agentes inductores de diferenciación en células monocíticas U-937.

Durante el proceso de diferenciación de las células monocíticas hay una disminución de la tasa de división celular, concomitante al aumento en la capacidad de realizar funciones efectoras. Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la proliferación de las líneas celulares, realizamos determinaciones de la reducción de la sal de tetrazolio: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil tetrazolio (MTT). El MTT es una sal de formazan que es reducido a un compuesto colorido en células viables. Por tanto, la cuantificación espectrofotométrica del MTT reducido se ha usado como una medida indirecta del número de células viables en un cultivo. En cultivos de células U-937 sin tratamiento, los valores de MTT reducido aumentan con el tiempo de cultivo, indicando un aumento en el número de células. Todos los tratamientos resultaron en una disminución del aumento de MTT reducido, sugiriendo una disminución de la tasa de proliferación celular: la VD3 indujo una disminución del 30%, con $\text{IFN}\gamma$ observamos una disminución del 35%, con RA del 60% y con PMA del 75% (Fig. 12).

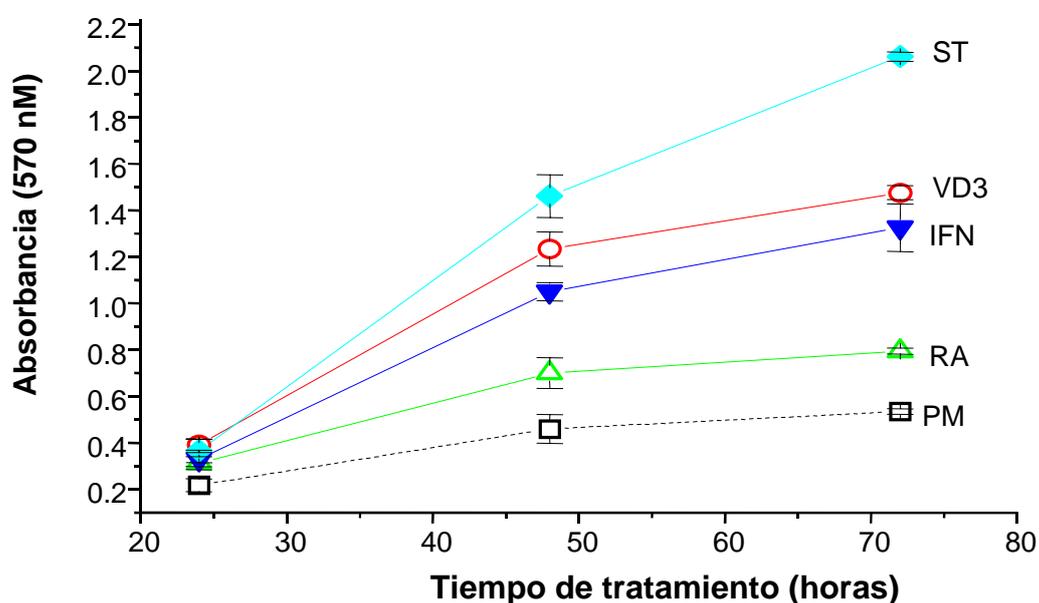


Fig. 12 Efecto de la diferenciación celular sobre la proliferación. Las células U-937 se trataron con PMA 50 nM, VD3 100 nM, RA 1mM o $\text{IFN}\gamma$ 100U/ml y la proliferación fue determinada por reducción de MTT. Las gráficas muestran la media \pm error estándar de 4 experimentos realizados por separado.

V.2.3 Cambios en el contenido de enzimas hidrolíticas causados por los agentes inductores de diferenciación en células monocíticas.

Las enzimas hidrolíticas de las células monocíticas juegan un papel importante en la destrucción de microorganismos patógenos, células senescentes y otras estructuras dañinas que pueden estar presentes en los tejidos. Para analizar el efecto de los agentes inductores de diferenciación sobre el contenido de enzimas hidrolíticas determinamos la actividad específica de las enzimas fosfatasa ácida y β -D-Glucuronidasa en lisados de células a distintos tiempos de tratamiento. Con $\text{IFN}\gamma$ y con VD3 no se detectaron cambios en la actividad enzimática. Sin embargo, el tratamiento con RA indujo un aumento significativo (de hasta 3 veces con respecto a las células sin tratar) en la actividad de β -D-glucuronidasa en células U-937 (Fig. 13). Detectamos también un aumento de 1.8 veces en la actividad de fosfatasa ácida en células THP-1 tratadas con PMA (Fig. 14).

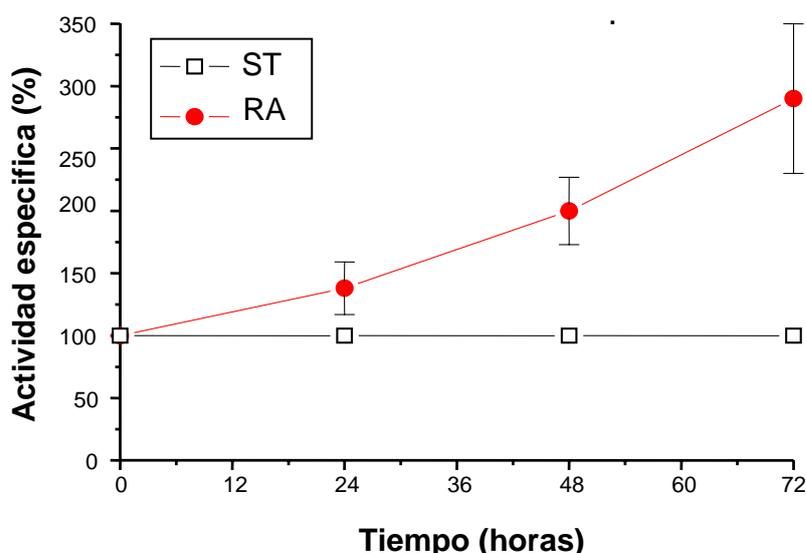


Fig. 13 Efecto del tratamiento con RA sobre la actividad específica de la enzima β -D glucuronidasa en células U-937. Las gráficas muestran la media \pm error estándar de 3 experimentos realizados por separado, presentados como el porcentaje de actividad enzimática en células tratadas con respecto al obtenido en células sin tratamiento (ST), a las que se les asignó el valor de 100%.

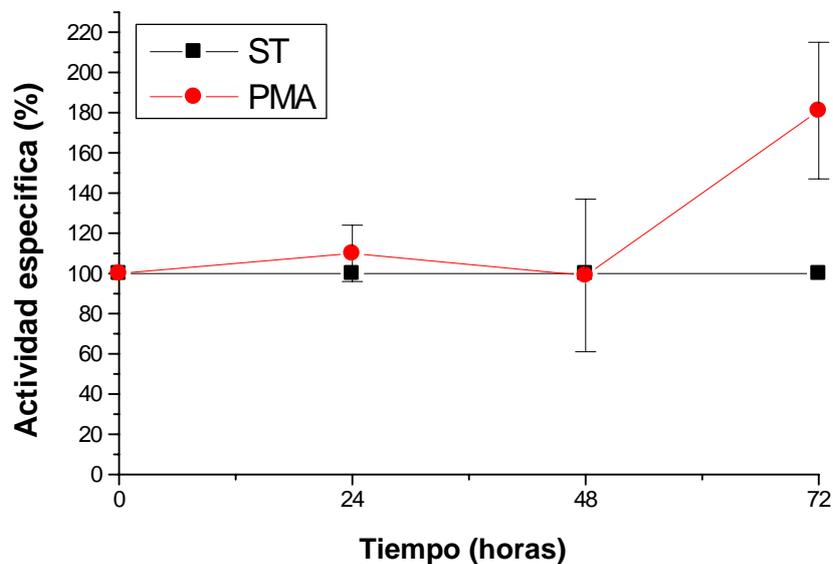


Fig. 14 Efecto del tratamiento con VD3 sobre la actividad específica de la enzima fosfatasa ácida en células U-937. Las gráficas muestran la media \pm error estándar de 3 experimentos realizados por separado, presentados como el porcentaje de actividad enzimática en células tratadas con respecto al obtenido en células sin tratamiento (ST), a las que se les asignó el valor de 100%.

V.2.4 Cambios en la capacidad fagocítica de células monocíticas causados por los agentes inductores de diferenciación.

La diferenciación de las células monocíticas se caracteriza también por una serie de cambios en las funciones efectoras como la fagocitosis. Para caracterizar el efecto de la diferenciación de las células monocíticas por los distintos agentes sobre la fagocitosis, analizamos la fagocitosis de glóbulos rojos opsonizados con IgG, en células THP-1 y U-937 antes y después de inducir la diferenciación celular.

El tratamiento con VD3 indujo un aumento significativo en la capacidad fagocítica de las células, y este aumento depende del tiempo de tratamiento, alcanzando un incremento de más de 10 veces a las 72 horas (Fig. 15). Ninguno de los otros tratamientos en las células U-937 o en las células THP-1 aumentó significativamente la fagocitosis de eritrocitos opsonizados.

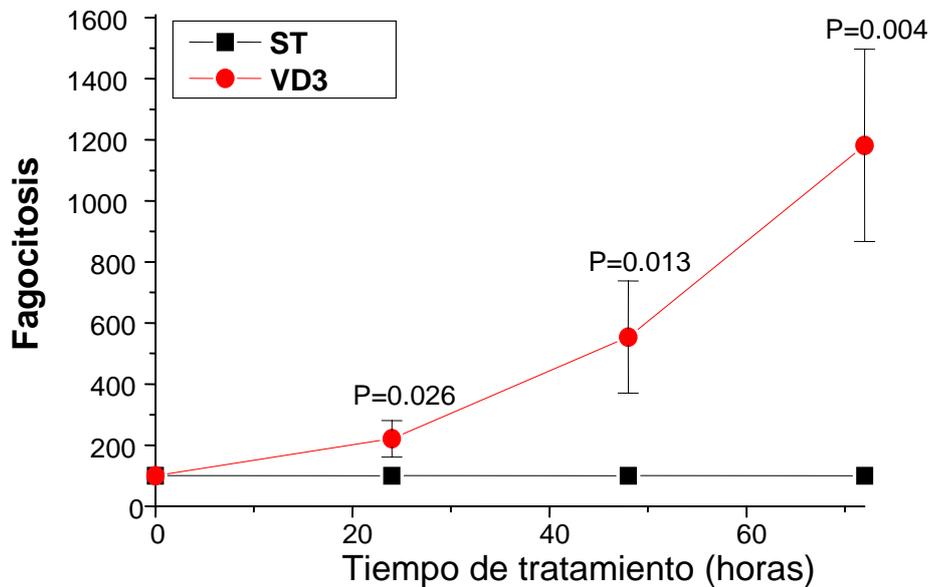


Fig. 15 Efecto del tratamiento con VD3 sobre la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG por células U-937. Las gráficas muestran la media \pm error estándar de 4 experimentos independientes, presentados como el porcentaje de fagocitosis en células tratadas con respecto al obtenido en células sin tratamiento (ST), a las que se les asignó el valor de 100%.

De los datos detallados en los párrafos previos relativos a los efectos de los distintos tratamientos sobre las líneas celulares U937 y THP-1, comprobamos que cada uno de los agentes empleados induce un conjunto de cambios fenotípicos distintos. Ya que nuestro objetivo era comparar las rutas de señalización mediada por Fc γ Rs en células en distintos estados de diferenciación, decidimos usar como modelo de estudio la diferenciación de células U-937 inducida por VD3, pues esta diferenciación trae consigo un aumento significativo de la fagocitosis mediada por estos receptores. Antes de proceder a estudiar las rutas bioquímicas de señalización inducida por los Fc γ Rs en células diferenciadas o no con VD3, determinamos el efecto de VD3 sobre la expresión de Fc γ RI y Fc γ RII, así como de dos marcadores de diferenciación de células monocíticas: CR3 y CD14.

V.2.5 La Vitamina D3 induce diferenciación de células U-937 caracterizada por un aumento de 10 veces en la fagocitosis mediada por los $Fc\gamma Rs$, sin un aumento significativo en la expresión de los $Fc\gamma Rs$.

Para comprobar que el tratamiento con VD3 induce la diferenciación de las células U-937, se determinaron los cambios inducidos por este agente sobre la expresión de dos receptores de membrana que se han empleado como marcadores de diferenciación de células monocíticas, el receptor tipo tres para complemento (CR3) y el antígeno CD14.

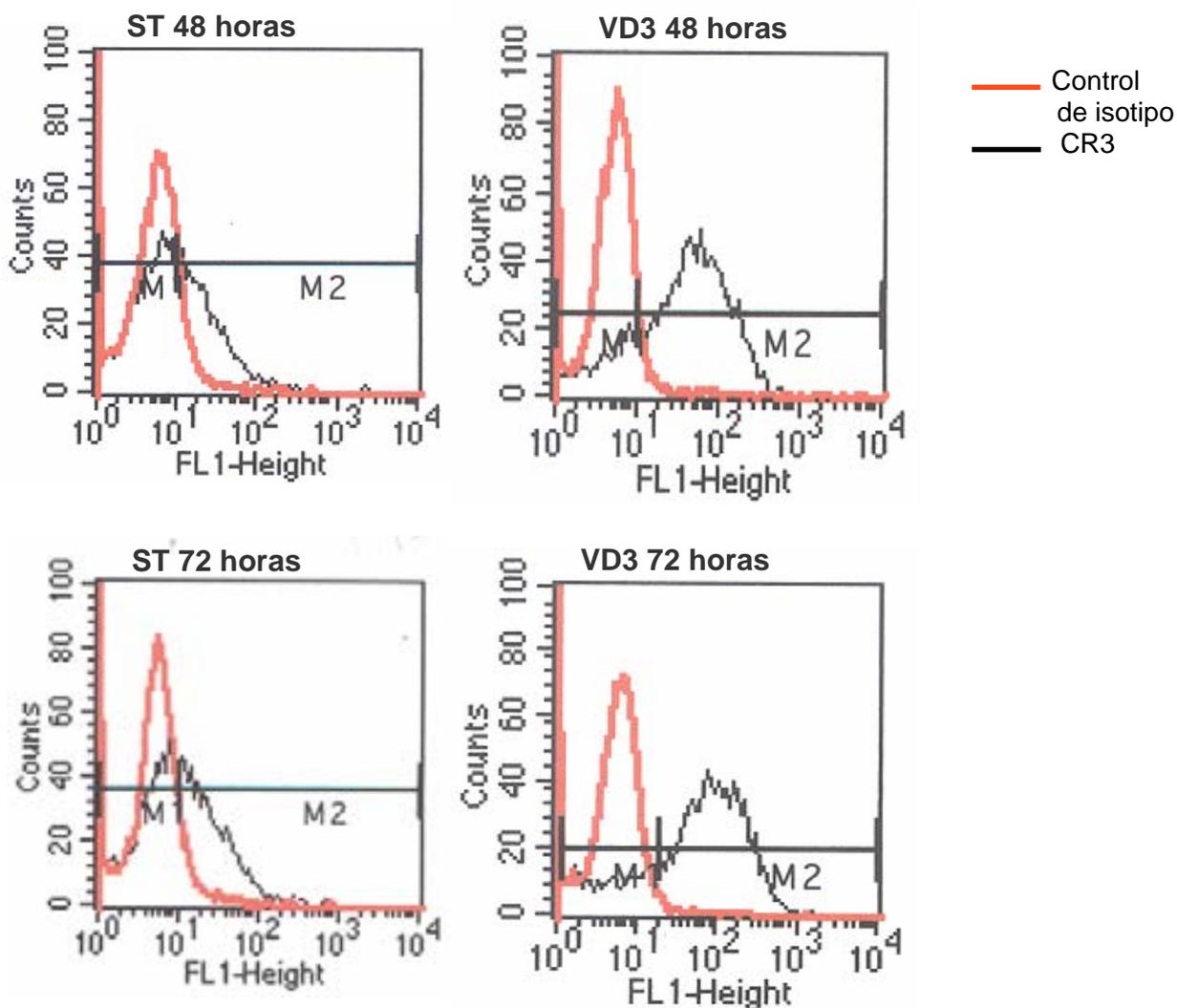


Fig. 16 Efecto del tratamiento con VD3 sobre la expresión en membrana del receptor CR3 en células U-937. Los histogramas son representativos de los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo.

Los cambios en la expresión en membrana de estos marcadores se determinaron por medio de inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo. La Fig. 16 muestra los histogramas representativos de un experimento de determinación de la expresión de CR3, y la Fig.17 agrupa los resultados de 4 experimentos.

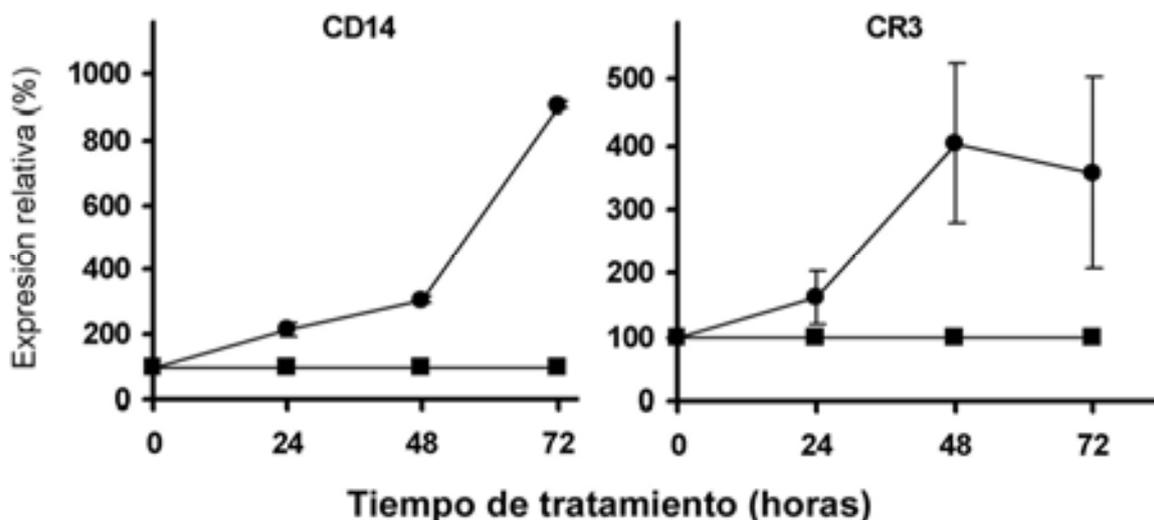


Fig. 17 Efecto del tratamiento con VD3 sobre la expresión de moléculas de superficie en células U-937. Las gráficas muestran la media \pm error estándar de 4 experimentos realizados por separado, presentados como el porcentaje de intensidad de fluorescencia en células tratadas (●) con respecto al obtenido en células sin tratamiento (■), a las que se les asignó el valor de 100%.

En cada experimento, se asignó un valor de 100% a la media de la intensidad de fluorescencia obtenida en células no tratadas (células control). Los valores correspondientes a la media de la intensidad de fluorescencia obtenidos de las células tratadas se expresaron como porcentaje de la media de intensidad de fluorescencia con respecto a las células control, designándose como “expresión relativa”. La VD3 indujo un incremento dependiente del tiempo en la expresión de ambos receptores observándose un incremento de 4 veces en la expresión de CR3, y de 9 veces en la expresión de CD14 a las 72 horas (Fig. 17).

La expresión de los receptores para IgG por la célula puede variar de manera dependiente del estado de diferenciación, por lo que, para determinar si el incremento en la fagocitosis inducida por VD3 se debía en parte a un incremento en la expresión de receptores Fc γ en las células diferenciadas, analizamos la expresión de las tres clases de

receptores para Fc de IgG ($Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RII$ y $Fc\gamma RIII$). El análisis se hizo por citofluorometría en las células U-937 antes y después de la diferenciación con VD3 por 24, 48 y 72 horas. Los resultados muestran un incremento de 0.8 veces en la expresión del $Fc\gamma RI$ y menor a 0.5 en la del $Fc\gamma RII$ a las 72 horas (fig. 18).

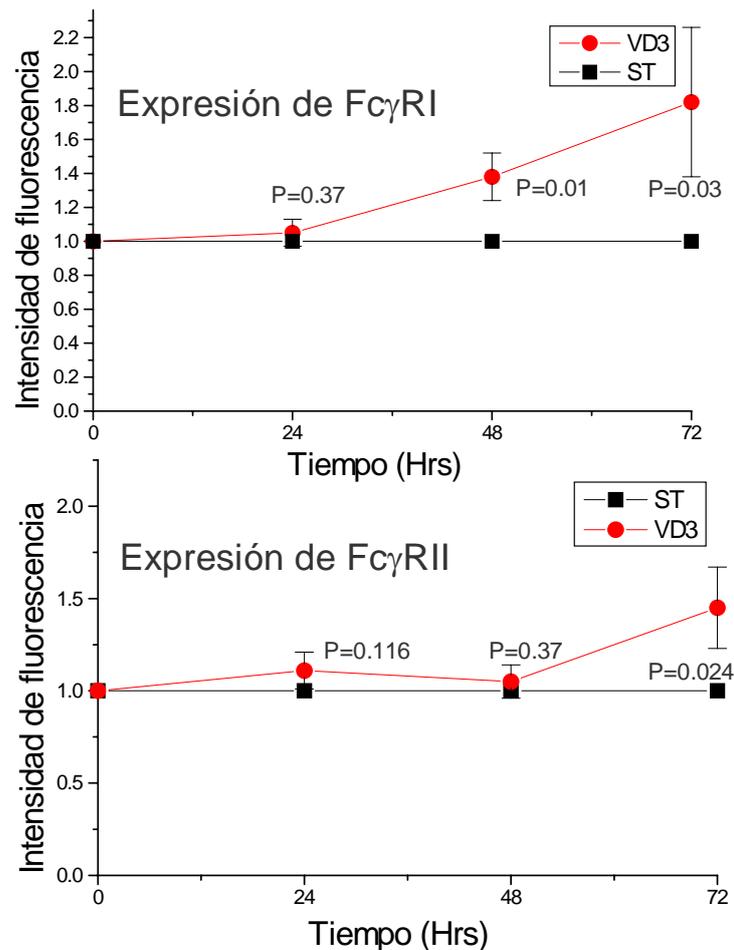


Fig. 18 Efecto del tratamiento con VD3 sobre la expresión de receptores $Fc\gamma RI$ (A) y $Fc\gamma RII$ (B) en células U-937. Las gráficas muestran la media \pm error estándar de 4 experimentos realizados por separado, presentados como el porcentaje de intensidad de fluorescencia en células tratadas con respecto al obtenido en células sin tratamiento (ST), a las que se les asignó el valor de 100%.

Además de las diferencias cuantitativas en el incremento de ambos receptores a las 72 horas, la cinética de este incremento también es distinta, ya que el receptor $Fc\gamma RI$ se incrementa desde las 48 horas sosteniéndose hasta las 72 horas, mientras que el incremento en el $Fc\gamma RII$ a las 48 horas no es detectable, haciéndose evidente hasta las 72

horas. Las células U-937 no expresan Fc γ RIII, y aunque se ha reportado que este receptor puede expresarse en células del linaje monocítico una vez que éstas maduran a macrófagos, no detectamos la expresión de este receptor con nuestras condiciones de tratamiento.

Dada la alta homología que existe entre las porciones extracelulares de las diferentes isoformas del Fc γ RII, utilizando el anticuerpo monoclonal IV.3 no podemos distinguir entre las isoformas activadoras (Fc γ RIIa, Fc γ RIIc) y las isoformas inhibitorias (Fc γ RIIb), por lo que era posible que si la VD3 modificase la relación cuantitativa entre las isoformas activadoras y las inhibitorias, aumentando la expresión de las primeras y disminuyendo en la misma proporción la de las segundas, no detectaríamos este cambio mediante citofluorometría. Para definir si la expresión de las isoformas del Fc γ RII se modifica con el tratamiento con VD3, determinamos cambios en los niveles de mRNA de las distintas isoformas, mediante RT-PCR semi-cuantitativo. Utilizamos iniciadores ("primers") para amplificar específicamente el cDNA para el Fc γ RI humano, Fc γ RIIa₁ y IIa₂, Fc γ RIIb₁ y IIb₂, Fc γ RIIc, y β -actina (como control).

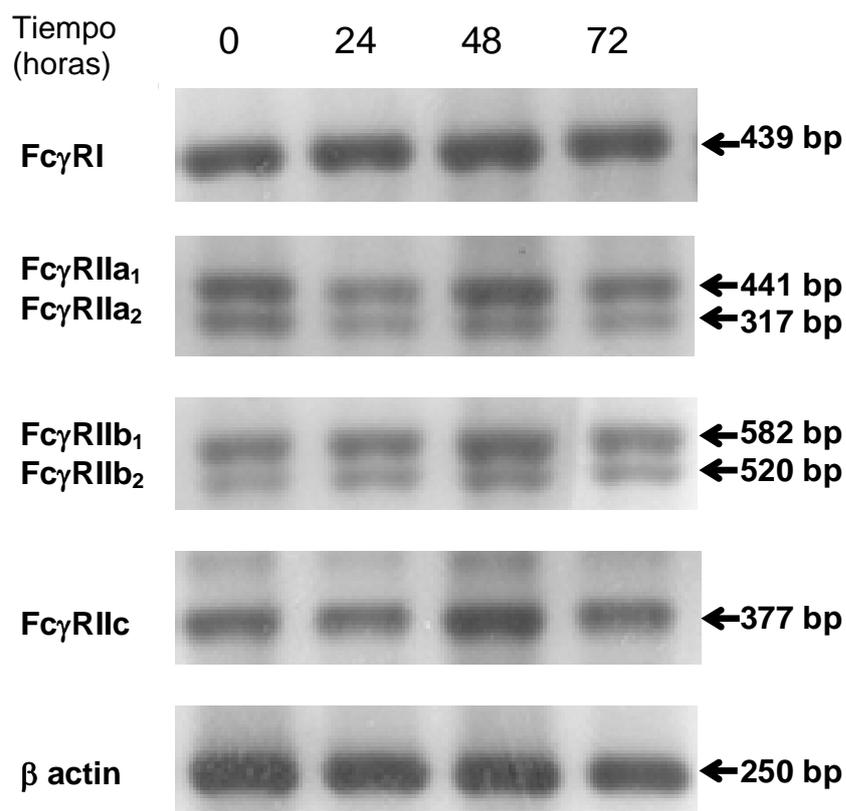


Fig. 19 Expresión de las isoformas de receptores Fc γ activadores e inhibitorios: Se aisló el RNA total de células U-937 diferenciadas y sin diferenciar, usando el método de extracción de isotiocianato de guanidina/fenol/cloroformo/ usando TRIzol. El RNA fué transcrito reversamente y se sometió a PCR usando primers específicos para las distintas isoformas de Fc γ R de membrana utilizando β -actina como control. Los productos del PCR se separaron en gel de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio.

La Figura 19 muestra el resultado de un experimento representativo de 4. Usando los primers específicos para los Fc γ RI, detectamos mediante RT-PCR una banda de 439 pb, que corresponde al transcrito Fc γ RI α . Con los primers para amplificar el mRNA correspondiente al Fc γ RIIa, se observaron dos productos de PCR, de 441 y 317 pb, correspondientes a los transcritos de Fc γ RIIa1 y Fc γ RIIa2.

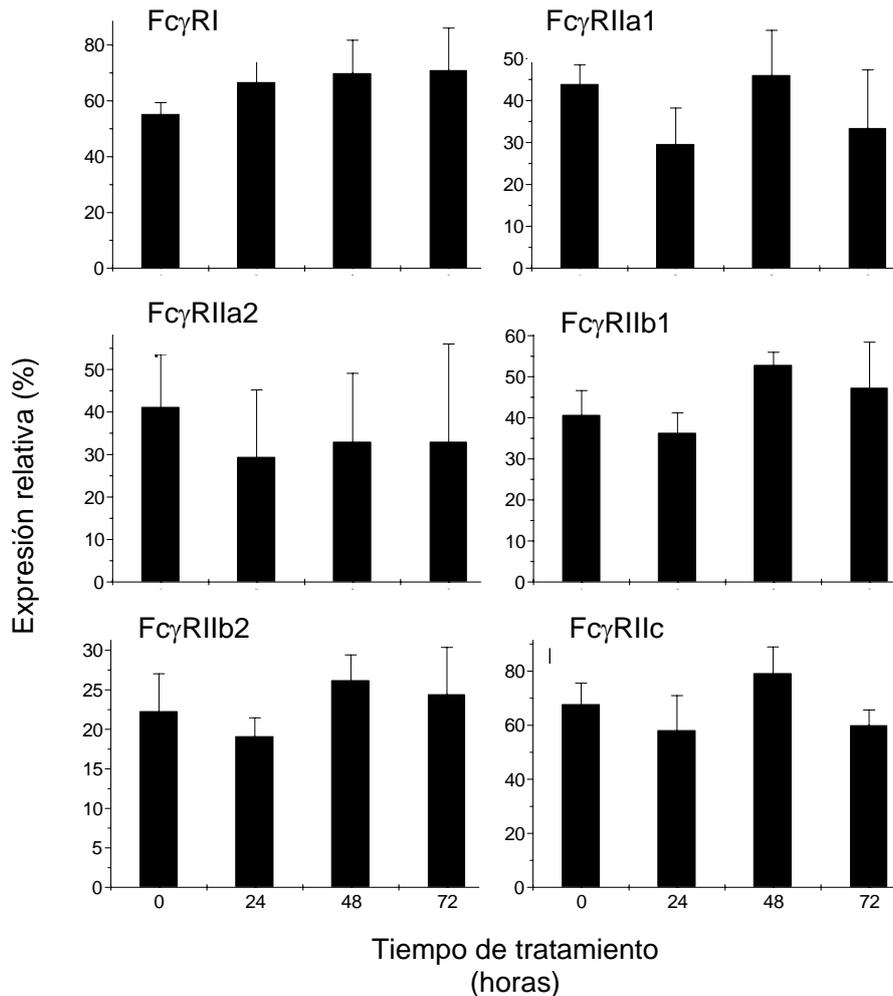


Fig. 20 Niveles de expresión relativa de los transcritos específicos para las isoformas de los FcR. Los valores de las bandas correspondientes a cada isoforma se obtuvieron normalizando los valores densitométricos de cada banda (Fig. 19) con respecto a la intensidad de la banda correspondiente al mRNA de actina. Las gráficas muestran la media \pm S.D. de tres experimentos independientes.

Dos productos de 582 y 520 pb, correspondientes al Fc γ RIIb1 y Fc γ RIIb2 se obtuvieron con los primers específicos para Fc γ RIIb. Con los primers específicos para Fc γ RIIc, observamos una banda de 377 pb, correspondiente al Fc γ RIIc. Los valores densitométricos obtenidos de

las bandas se normalizaron con respecto a la intensidad de la banda utilizada como control interno (β -actina). El promedio de los datos obtenidos de cuatro experimentos realizados por separado mostraron que no hay cambios significativos en los niveles de expresión de ninguno de los diferentes transcritos analizados (Fig 20). Estos datos sugieren que el aumento en la fagocitosis mediada por los receptores $Fc\gamma$ inducido por VD3, no se debe a una variación significativa en la expresión de las diferentes isoformas de $Fc\gamma$ Rs.

En resumen, el tratamiento de las células U-937 durante 72 horas con VD3 (100 nM) induce la adhesión entre células y la adhesión de aproximadamente el 30% de las células a la caja de cultivo. Se observó también una disminución del 30% en la proliferación celular. También induce un aumento marcado en las moléculas de superficie CD14 y CR3. De manera importante, se observa un muy importante incremento en la fagocitosis. En resumen, el tratamiento con VD3 durante 72 hrs nos permitió obtener una población de células fenotípicamente distintas de las iniciales, presentándose como un modelo adecuado interesante para evaluar los cambios bioquímicos involucrados en la diferencia en las funciones efectoras en las células en diferentes estados de diferenciación.

V.3. Activación de las cinasas de tirosina Syk y Lyn inducida por $Fc\gamma$ Rs en células U-937 en distintos estados de diferenciación.

V.3.1 La diferenciación inducida por VD3 aumenta la activación de Syk mediada por $Fc\gamma$ RI y $Fc\gamma$ RII.

El entrecruzamiento de las isoformas activadoras de $Fc\gamma$ R en células monocíticas induce la fosforilación inmediata de las tirosinas contenidas en la secuencia consenso ITAM. Esta fosforilación es catalizada por la cinasa de la familia Src, p53-56 Lyn (Malbec, O. 2002; Post, C.B. 1999). El ITAM fosforilado sirve como sitio de unión para proteínas con dominios SH2, incluyendo a la cinasa de tirosina Syk. La unión de Syk da lugar a su activación, capacitándola para fosforilar a sus sustratos continuando con la cascada de señalización (Wang, A. 1994; Chacko G. 1994; Ghazizadeh, S. 1994; Turner, M. 2000; Yanagi, S. 2001; van Oers, N.S. 1995). El papel esencial de Syk para conectar señales tempranas mediadas por $Fc\gamma$ R a funciones efectoras ha sido demostrado por varios autores. Por ejemplo, se ha demostrado una completa inhibición de la fagocitosis por piceatannol, inhibidor específico de la cinasa Syk (Majeed, M. 2001; Raeder, E.M. 1999), así como la inhibición de la expresión de Syk por nucleótidos antisentido (Matsuda, M., 1996). Se ha demostrado también que

macrófagos derivados de ratones deficientes de Syk no son capaces de fagocitar partículas opsonizadas con IgG (Crowley, M.T. 1997).

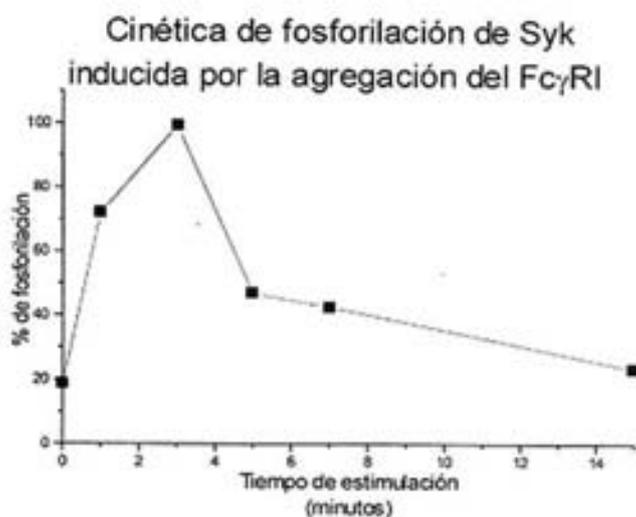
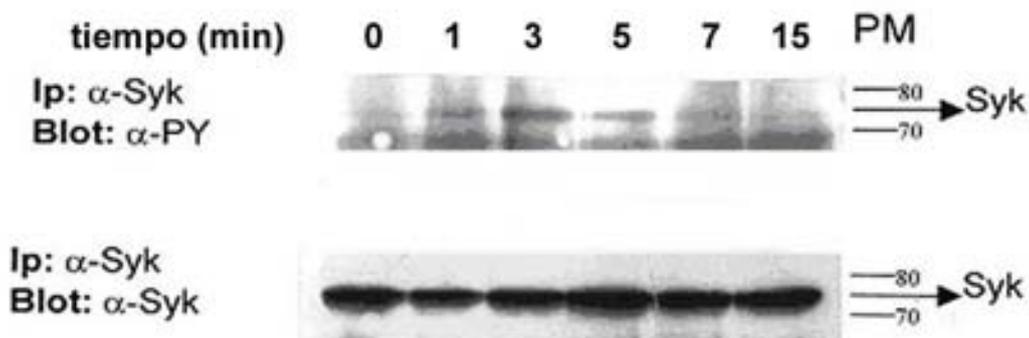


Fig. 21 *Cinética de fosforilación de Syk inducida por el entrecruzamiento del Fc γ RI.* 15x10⁶ células U-937 se estimularon por diferentes tiempos con fragmentos anti Fc γ RI agregados con fragmentos de un anticuerpo secundario. Las células se lisaron, se inmunoprecipitó la cinasa Syk y se analizó mediante inmunoblot antifosfotirosina. Los anticuerpos fueron eluidos y el blot se analizó con anticuerpos anti-Syk

Para explorar las bases bioquímicas del incremento en la fagocitosis mediada por receptores Fc γ inducido por la diferenciación, analizamos comparativamente la expresión de las cinasas Syk y Lyn y su activación en respuesta al entrecruzamiento de los Fc γ R en células monocíticas U-937, antes y después de la diferenciación inducida por VD3.

Analizamos el curso temporal de la fosforilación de Syk inducida por el entrecruzamiento de Fc γ Rs en las células U-937, antes y después de la diferenciación con VD3. Como se muestra en las figuras 21 y 22, el entrecruzamiento de los Fc γ RI y Fc γ RII en células U-937 induce un incremento en la fosforilación de Syk dependiente del tiempo, observándose el

máximo nivel de fosforilación a los tres minutos. Bajo las mismas condiciones de estimulación se hizo la cinética de activación de células tratadas con VD3, observando resultados similares a los obtenidos con las células sin tratamiento, alcanzándose el grado máximo de fosforilación también a los tres minutos (no mostrado).

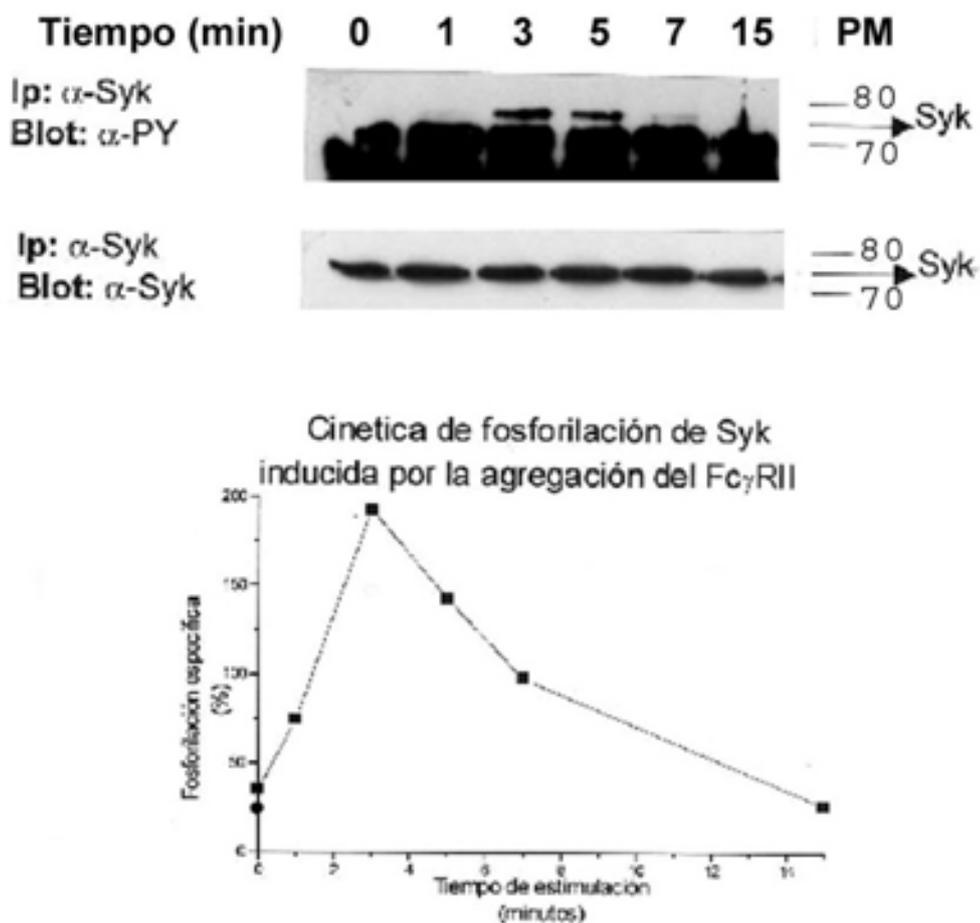


Fig. 22 *Cinética de fosforilación de Syk inducida por el entrecruzamiento del $Fc\gamma RII$.* 15×10^6 células U-937 se estimularon por diferentes tiempos con fragmentos anti $Fc\gamma RII$ agregados con fragmentos de un anticuerpo secundario. Las células se lisaron, se inmunoprecipitó la cinasa Syk y se analizó mediante inmunoblot antifosfotirosina. Los anticuerpos fueron eluidos y el blot se analizó con anticuerpos anti-Syk

Para analizar el efecto de la diferenciación sobre la fosforilación de Syk inducida por la activación de los receptores $Fc\gamma$, células tratadas con VD3 y células sin tratamiento se estimularon durante tres minutos a través de los receptores $Fc\gamma RI$ y $Fc\gamma RII$, con cantidades saturantes de anticuerpos anti-receptor específicos, agregándolos con un segundo anticuerpo. Syk se inmunoprecipitó de lisados de las células y su nivel de fosforilación se

analizó por medio de inmunoblot anti-fosfotirosina. Los anticuerpos anti-fosfotirosina se eluyeron, y el blot se analizó con anticuerpos anti-Syk para determinar el contenido de Syk en cada inmunoprecipitado. La figura 23 muestra un experimento representativo de 5 que se realizaron de forma independiente.

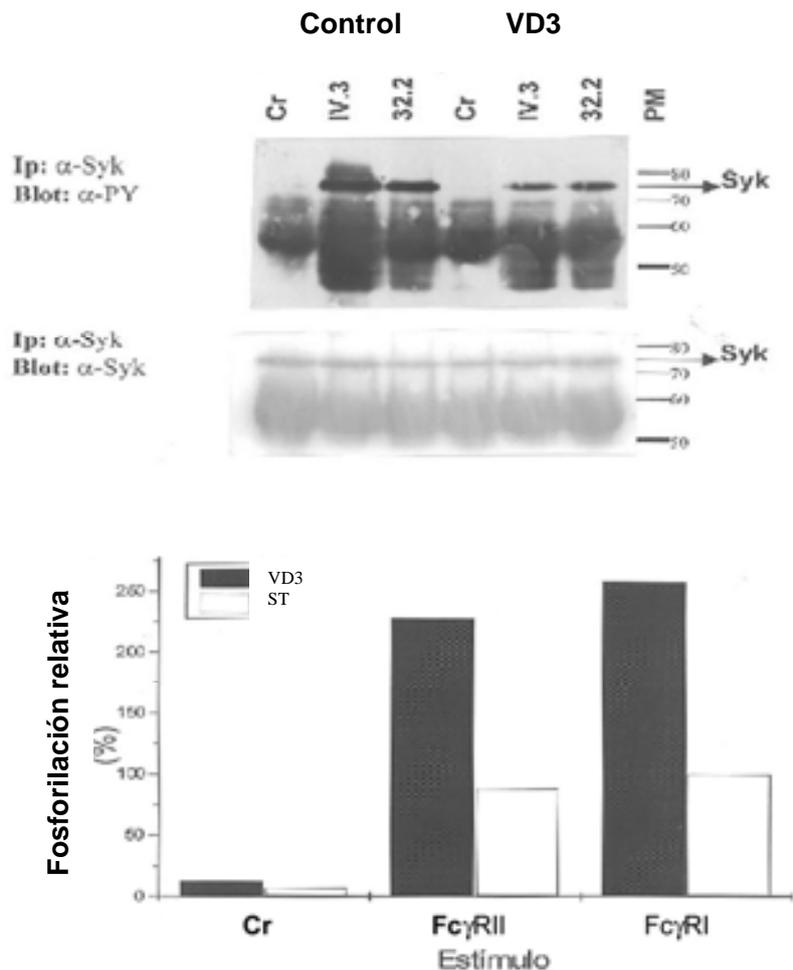


Fig. 23 Fosforilación de Syk inducida por la diferenciación con VD3. 15×10^6 cels U-937 sin tratar o tratadas con VD3 por 72 horas se estimularon a través de los receptores Fc γ RI o II durante 3 min, de los lisados celulares se inmunoprecipitó la cinasa Syk y se analizó su fosforilación mediante blot anti-fosfotirosina. Se hizo el análisis densitométrico de las bandas obtenidas de tres experimentos independientes y se calculó el radio Syk fosforilada/Syk total.

La intensidad de las bandas obtenidas en el blot antifosfotirosina y en el blot anti-Syk se analizaron densitométricamente y se calculó el cociente Anti-PY/anti-Syk (fosforilación

relativa). La gráfica en la Fig 23 muestra el promedio \pm SD de de los valores de fosforilación relativa obtenidos en 5 experimentos independientes, mostrando que la fosforilación en tirosina de Syk inducida por la activación de los Fc γ RI y por los Fc γ RII aumenta alrededor de 2.5 veces después del tratamiento con VD3, con respecto a la fosforilación inducida en células sin tratamiento. Al comparar los niveles de fosforilación de Syk inducidos por el Fc γ RI con los inducidos por el Fc γ RII no se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de receptores, ni en células sin tratamiento ni en células inducidas a diferenciación con VD3.

V.3.2 Efecto de la VD3 sobre la expresión de las cinasas Syk y Lyn.

En el blot anti-Syk podemos observar cantidades similares de la proteína Syk inmunoprecipitada entre células tratadas y no tratadas, sugiriendo que la expresión de la proteína Syk no es modificada cuantitativamente por el tratamiento. Sin embargo, existe la posibilidad de que los cambios en la cantidad de Syk inducidos por la diferenciación no sean detectados porque los anticuerpos anti-Syk en los inmunoprecipitados están en cantidades limitantes, inmunoprecipitando igual cantidad de Syk en cada muestra y dejando cantidades diferentes de Syk sin inmunoprecipitar.

Para examinar de manera directa si la Vitamina D3 induce cambios en los niveles de expresión de las cinasas Syk y Lyn, comparamos la cantidad de cinasa inmuno-detectable en lisados totales utilizando anticuerpos específicos para cada una. Se utilizaron lisados totales provenientes de diferentes números de células tratadas y sin tratar, y fueron analizados por medio de inmunoblot anti-Syk. Posteriormente los anticuerpos del blot se eluyeron y el mismo blot se analizó usando anticuerpos anti-Lyn. Después de una segunda elución, se detectó la cantidad de actina en los lisados, como control interno para ajustar las cantidades de proteína celular en cada carril.

La expresión de Syk no fue modificada de manera cuantitativa, ya que al comparar igual número de células tratadas y sin tratar, la intensidad de las bandas que corresponden a Syk y a actina en células tratadas es igual a la de las células sin tratamiento (Fig. 24, comparar carril 1 con 4, 2 con 5 y 3 con 6). Por el contrario, el tratamiento con VD3 induce un incremento de 2.5 veces en la expresión de Lyn.

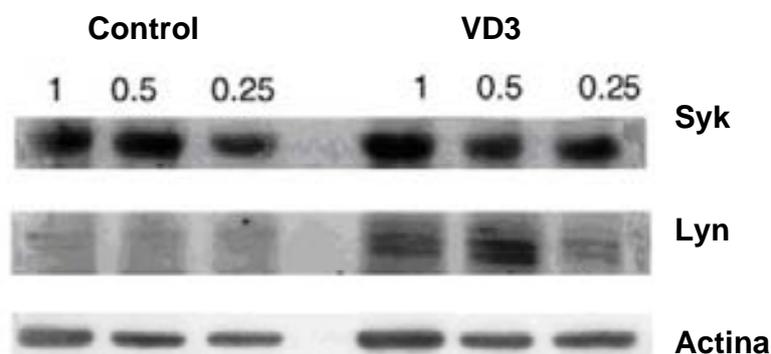


Fig. 24 Expresión de Syk y Lyn en células diferenciadas. Lisados de células U-937 sin tratar o tratadas con VD3 fueron analizados mediante inmunoblot anti-Lyn, anti-Syk o anti actina. Diferente número de células fueron cargadas en cada carril, y actina se utilizó como control de expresión.

V.3.3 La fosforilación de Lyn inducida por el entrecruzamiento de los Fc γ RI y Fc γ RII aumenta significativamente después del tratamiento con Vitamina D3.

En los resultados anteriores mostramos que el tratamiento con Vitamina D3 induce un aumento en el nivel de expresión de Lyn, así como también un aumento en el grado de fosforilación de Syk. Se ha propuesto que Syk es activada por fosforilación en tirosina dependiente de la cinasa Lyn. Para determinar si el aumento en la fosforilación de Syk en células tratadas está relacionado con un incremento en el nivel de fosforilación de Lyn, comparamos su nivel de fosforilación en células tratadas y sin tratamiento. Las células se estimularon a través del Fc γ RI o del Fc γ RII y la fosforilación de Lyn se determinó por inmunoprecipitación anti-Lyn e inmunoblot anti-fosfotirosina. La cantidad de Lyn en los inmunoprecipitados se verificó por medio de inmunoblot anti-Lyn, después de la elución de los anticuerpos antifosfotirosina del blot. Se calculó el radio de la intensidad densitométrica obtenida del blot anti-PY y del blot anti-Lyn (fosforilación relativa). La figura 25 muestra un experimento representativo, y la gráfica muestra los datos combinados de tres experimentos realizados por separado.

En las células U-937 sin tratamiento, se detecta un modesto aumento en la fosforilación de Lyn después del entrecruzamiento (43% en células no estimuladas, 52% en células estimuladas a través del Fc γ RI, y 58% a través del Fc γ RII). A pesar de el incremento tan modesto que detectamos en el grado de fosforilación de Lyn cuando inmutprecipitamos la cinasa y hacemos blot anti fosfotirosina, bajo las mismas condiciones de estimulación,

cuando inmunoprecipitamos proteínas fosforiladas en tirosina y hacemos blot anti Lyn observamos un incremento significativo en la estimulación de Lyn, que coincide con los reportes previos de un incremento en la fosforilación de Lyn después del entrecruzamiento de los Fc γ R.

En las células tratadas con Vitamina D3, el nivel basal en la fosforilación de Lyn aumenta tres veces comparado con el nivel de fosforilación en las células sin tratamiento. Después de la estimulación, observamos un aumento de seis veces en el nivel de fosforilación de Lyn. No observamos diferencias en la fosforilación inducida entre los diferentes Fc γ Rs (Fc γ RI y Fc γ RII), ni en células sin tratamiento ni en células tratadas.

Dado que el incremento en la expresión de los receptores Fc γ RI y Fc γ RII fue de apenas 0.5 veces, el aumento en la fosforilación de Lyn sugiere que en las células tratadas con Vitamina D3, los Fc γ Rs agregados son más eficientes en promover la fosforilación de las cinasas Lyn y Syk.

Nuestros resultados muestran que la VD3 induce un incremento de 10 veces en la capacidad fagocítica sin inducir un incremento similar en la expresión de los receptores Fc γ . Los niveles de fosforilación de Syk y de Lyn aumentan y aunque la expresión de Syk no se modifica, la expresión de Lyn es más alta después de la diferenciación. Estos resultados muestran que Syk y Lyn son reguladas de manera diferente en las células monocíticas en distintos estados de diferenciación. Podemos afirmar que la señalización a través de una misma clase de receptor Fc γ puede variar no solamente dependiendo de la magnitud del estímulo, sino también de manera dependiente del estado de diferenciación de las células.

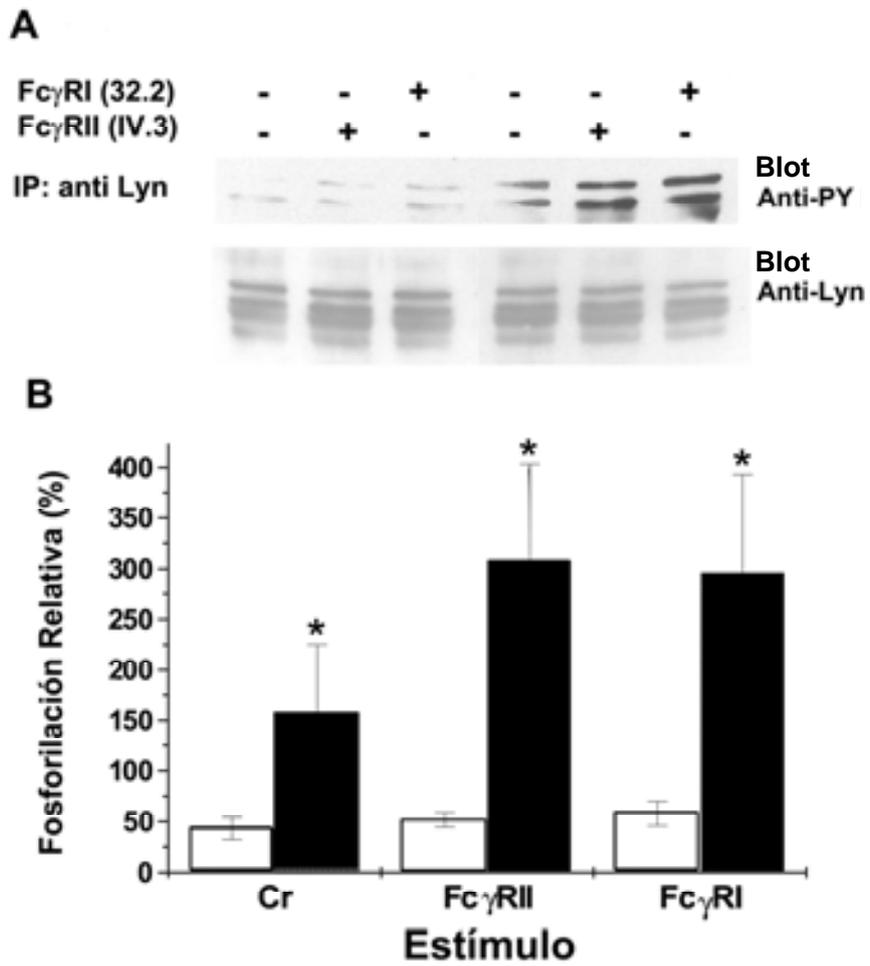


Fig. 25 Fosforilación de Lyn inducida por la diferenciación con VD3. 15×10^6 cels U-937 sin tratar o tratadas con VD3 por 72 horas se estimularon a través de los receptores Fc RI o II durante 3 min, de los lisados celulares se inmunoprecipitó la cinasa Lyn y se analizó su fosforilación mediante blot anti-fosfotirosina (A). Se hizo el análisis densitométrico de las bandas obtenidas de tres experimentos independientes y se calculó el radio Lyn fosforilada/Lyn total (B).

VI. DISCUSIÓN

Se ha descrito una visión general de los mecanismos bioquímicos por los cuales las isoformas activadoras de los Fc γ Rs median la activación celular (Pan, L. 2003), pero no se ha estudiado con detalle la influencia de algunos factores sobre la respuesta celular final, como es el estado de diferenciación de la célula en la que se expresan los receptores.

Las células del sistema fagocítico mononuclear llevan a cabo un proceso de maduración complejo que depende de diversos estímulos externos, dando lugar a diferentes fenotipos de macrófagos.

Normalmente, la diferenciación de monocitos a macrófagos involucra un aumento en la capacidad de algunas funciones efectoras mediadas por los Fc γ Rs. Debido a que la diferenciación comúnmente induce un aumento en la expresión de Fc γ Rs, frecuentemente se asume que el aumento en la capacidad efectora está relacionado con un aumento en la expresión de los receptores, sin embargo, la posibilidad de que los cambios en las funciones efectoras inducidos por la diferenciación se deban a una señalización más eficiente a través de los Fc γ Rs, no había sido demostrada.

Se sabe que *in vivo*, la diferenciación de monocitos puede seguir diferentes vías, dando lugar a distintas poblaciones de células (Auger, M.J. 1992), dependiendo de factores microambientales. Se ha demostrado que en líneas de células monocíticas pueden inducirse algunos cambios relacionados con la diferenciación *in vitro*, utilizando agentes inductores, como el INF γ , el PMA, el RA y la VD3 (1 α , 25 dihidroxi Vitamina D3). En este trabajo corroboramos que los diferentes agentes inductores de diferenciación dan lugar a poblaciones celulares con distintos fenotipos, ya que encontramos diferencias en marcadores de superficie, enzimas y funciones efectoras que dependieron del agente utilizado para inducir la diferenciación.

Además, observamos que el tratamiento de dos líneas celulares monocíticas diferentes (THP-1 y U-937), analizadas bajo las mismas condiciones, induce cambios fenotípicos diferentes. Estos resultados concuerdan con nuestra hipótesis, pues las células U-937 y THP-1, aunque ambas son del linaje monocítico, tienen diferentes estados de maduración, por lo que, al expresar diferentes moléculas (ya sea

cualitativa o cuantitativamente) la respuesta celular al agente inductor será distinta, y es entendible observar distinto fenotipo.

La fagocitosis mediada por los receptores $Fc\gamma$ es un proceso importante mediante el cual las células fagocíticas profesionales internalizan a los microorganismos invasores, representando un paso fundamental en la eliminación de agentes patógenos y la presentación de sus antígenos. La diferenciación de los fagocitos mononucleares a menudo se acompaña por un incremento en la capacidad fagocítica (David W. H. 2000). Nosotros determinamos la fagocitosis de glóbulos rojos opsonizados con IgG en células U-937 antes y después de inducir la diferenciación mediante el tratamiento con VD3. Observamos un aumento dependiente del tiempo en la actividad fagocítica, que alcanza un promedio mayor de 10 veces en el aumento a las 72 horas de tratamiento (fig. 18).

Otros cambios relacionados con la diferenciación en las células U-937 tratadas con VD3 fueron un aumento en la expresión de CD14 y CR3, un menor índice de proliferación, y un aumento en la adhesión celular. Oberg y su grupo reportaron que la VD3 induce un aumento en el porcentaje de células U-937 que expresan CD14, pero no demostraron la magnitud del aumento en las poblaciones celulares. En concordancia, nosotros observamos un aumento de 9 veces en la expresión de CD14 a las 72 horas de incubación con VD3 100 nM. Podemos concluir que esta molécula es un buen marcador de la diferenciación inducida por VD3 en células U-937, bajo nuestras condiciones de tratamiento.

Por otro lado, como se observó mediante fluorocitometría de flujo, la VD3 induce un incremento muy pequeño (0.5 veces) en la expresión de ambos receptores de superficie, $Fc\gamma$ RI y $Fc\gamma$ RII. Sin embargo, debido a la alta homología en las porciones extracelulares de diferentes isoformas de $Fc\gamma$ RII, los anticuerpos IV.3 reconocen a las isoformas activadoras así como a las inhibitorias, por tanto, si la VD3 induce cambios en la proporción de receptores inhibidores y activadores podría tener un efecto importante sobre la fagocitosis mediada por los receptores $Fc\gamma$, ya que se ha demostrado que los macrófagos murinos $Fc\gamma$ RIIb^{-/-} tienen mayor capacidad para fagocitar partículas opsonizadas con IgG (Clynes, R. 1993), y que la coagregación de $Fc\gamma$ RIIb con receptores de antígeno (BCR, TCR, $Fc\gamma$ Rs) dá lugar a una regulación negativa de la activación celular, a través de la acción de fosfatasa que contienen

dominios SH2, reclutadas en los ITIMs de los Fc γ RIIb (Sarkar, S., 1996, DeFranco, A.L. 1995).

Por lo anterior, determinamos si la VD3 modifica la expresión relativa de las isoformas activadoras/inhibitorias, usando un método de RT-PCR semicuantitativo. En contraste a lo reportado con células THP-1, en donde Fc γ RIIb2 es la isoforma predominante (Agramonte-Hevia, J. 2003), en las células U-937 el Fc γ RIIb1 se expresa más abundantemente, aunque el Fc γ RIIb2 también se detectó en los 4 experimentos realizados por separado.

Aún cuando la VD3 indujo un aumento de más de 10 veces en la fagocitosis mediada por Fc γ R, no detectamos cambios significativos en los niveles de mRNA para ninguna de las isoformas de Fc γ R. De esta manera, la diferenciación de las células U-937 por VD3 resulta un modelo adecuado para estudiar los mecanismos independientes de la expresión de receptores Fc γ , involucrados en el aumento de las funciones efectoras de los macrófagos.

En nuestros estudios, el entrecruzamiento de los Fc γ RI y Fc γ RII en células diferenciadas con VD3, induce un mayor nivel de fosforilación de Syk en comparación con las células no diferenciadas. Este aumento en la fosforilación no correlaciona con un aumento en el nivel de expresión de la proteína Syk. Aún cuando se sabe que Syk participa en el desarrollo de células B y de células T (Turner, M. 2000; Cheng, A.M., 1995; Mallick-Wood, C.A. 1996), su participación en la diferenciación de células mieloides no ha sido definida, sin embargo, es clara la importancia de la activación de esta cinasa en la señalización mediada por Fc γ Rs, así como por otros inmunoreceptores como el BCR y el Fc ϵ RI, por lo que su aumento en la fosforilación puede estar relacionado con la regulación de otras proteínas que participan en la cascada de señalización mediada por los Fc γ Rs.

En estudios in vitro usando las células promonocíticas HL-60, se ha reportado una regulación positiva en la expresión de Syk cuando se induce la diferenciación a granulocitos utilizando RA (Qin, S. 1997). En nuestros estudios observamos que en las células U-937 diferenciadas con VD3, la expresión de Syk no se modifica. Estos resultados contrastan con los observados en células THP-1, otra línea celular monocítica humana (Agramonte-Hevia, J. 2003), en donde la expresión de Syk

incrementa bajo las mismas condiciones de tratamiento que las células U-937. Aunque las bases moleculares para los diferentes efectos de la VD3 sobre distintas líneas celulares no se conocen, pensamos que pueden estar relacionadas con los distintos estados de maduración de las células de cada línea, sobresaltando la relevancia del estado de maduración celular sobre la respuesta a los estímulos de diferente naturaleza (inductores de diferenciación, ligandos para receptores $Fc\gamma$, etc). Como se observa en este y otros trabajos (Katagiri, K. 1991), la expresión diferencial de algunas moléculas y el estado de activación de las cinasas pueden ser importantes en la regulación de la señalización celular en células en diferentes estados de diferenciación. Las diferencias en la regulación podrían deberse tanto a factores cuantitativos como a factores de orientación topográfica de las proteínas.

La fosforilación de Syk y su activación requieren de la fosforilación previa de las secuencias ITAM que se encuentran en la porción citoplásmica de los receptores, la cual es catalizada por cinasas de la familia Src. En células monocíticas, se ha demostrado que el entrecruzamiento de los $Fc\gamma R$ promueve la fosforilación y activación de la cinasa de la familia Src, p53/56 Lyn, y que esta se asocia a los $Fc\gamma R$ después del entrecruzamiento (Wang AV, 1994; Katagiri K 1991; Durden DL 1994), sugiriendo que Lyn es la cinasa responsable de la fosforilación de los ITAMs. El papel esencial de Lyn se ha demostrado en experimentos de reconstitución, en donde se observa que Lyn restaura la capacidad fagocítica en células $Lyn^{-/-}$ (Suzuki T, 2000).

Nosotros observamos que la VD3 induce un aumento relativo de 2.5 veces en la expresión de la proteína Lyn, y que el entrecruzamiento de los $Fc\gamma R$ en células diferenciadas resulta en un aumento en su fosforilación, comparando con el nivel de fosforilación en las células sin diferenciar. El aumento en la fosforilación no es causado solamente por el aumento en la cantidad de proteína, ya que nuestros datos muestran que después de la diferenciación hay un porcentaje más alto de Lyn fosforilada después del entrecruzamiento de los receptores $Fc\gamma$, aún cuando se compara la misma cantidad de proteína en células no tratadas y tratadas. Los niveles de expresión relativa de las diferentes isoformas de $Fc\gamma R$ no cambian después de la diferenciación, lo que sugiere que en las células U-937 tratadas con VD3 los

agregados son más eficientes, por unidad de agregado, para inducir la fosforilación de Lyn y de Syk.

Lyn es una proteína muy estudiada al nivel génico. Se conocen dos cDNAs que codifican para dos proteínas de 53 y 56 kDa, y los dos transcritos son generados por procesamiento alternativo. Durante nuestro estudio, detectamos tres proteínas reconocidas de manera específica tanto por los anticuerpos policlonales anti-Lyn como por los monoclonales. Se sabe que algunas modificaciones post-trascripcionales, como la fosforilación, inducen cambios en la migración en geles de poliacrilamida, por lo que la tercera banda reconocida por los anticuerpos anti-Lyn puede corresponder a un pool de Lyn con diferente nivel de fosforilación.

No sabemos los mecanismos responsables del aumento en la capacidad de los Fc γ R para inducir la activación de las cinasas cuando son agregados en células diferenciadas. Pensamos que la diferenciación puede modular la expresión de alguna proteína de membrana cuya función es ayudar a los Fc γ Rs a inducir la activación celular. Otra posibilidad es que la diferenciación facilita o prolonga la asociación de los Fc γ Rs a las balsas lipídicas, sitios en donde se propone que se lleva a cabo la señalización (Pizzo, P 2004; Sharma P 2004; Gomez-Mouton C 2004). Es probable que la diferenciación induzca un mayor número de moléculas fosforiladas, pero así mismo, el aumento observado en la fosforilación de Syk podría ser debido a un mayor grado de fosforilación dentro de cada molécula.

La activación de los Fc γ Rs se lleva a cabo en las balsas lipídicas. Si los complejos de señalización pueden ser restringidos topográficamente, las proteínas de señalización (Lyn, Syk, receptores) podían segregarse de manera distinta en células en diferentes estados de diferenciación. El aumento en la fosforilación en diferentes residuos en la misma proteína podía ser una señal para la segregación. Por ejemplo, Syk podría estar fosforilada en diferentes sitios o en sitios adicionales cuando las células se diferencian, haciendo más eficiente su localización en balsas lipídicas y/o su actividad catalítica.

Por otra parte, el aumento en la expresión de una proteína podría alterar su segregación por simple probabilidad, así, al haber más Lyn en la célula puede haber

más Lyn en balsas lipídicas y aumentarse la eficiencia de la señalización de manera dependiente de esta cinasa, haciéndose también más eficiente la respuesta celular.

Los avances en el estudio de la biología celular permiten tener clara la importancia de la compartimentalización en el metabolismo de las células. Las cinasas que participan en la señalización mediada por Fc γ Rs son compartidas en vías de señalización mediadas por muchos otros receptores, pero no se sabe si hay pools de cinasas para cada receptor en compartimentos específicos o hay un solo pool de las proteínas que puede ser utilizada por cualquier tipo de receptores.

Se ha demostrado que la fosfatasa SHP-1 modula negativamente la fosforilación de Syk inducida a través de los Fc γ R (Huang, Z.T. 2003; Ganesan, L.P. 2003), por lo que otro posible mecanismo que explica los resultados observados en este trabajo es que el aumento en la fosforilación de Lyn y Syk sea debido a un decremento en la expresión o una disminución en la activación de proteínas fosfatasas involucradas en la regulación negativa.

Independientemente del mecanismo involucrado, nuestros resultados indican que la capacidad de señalización de los receptores Fc γ depende de manera importante del estado de diferenciación de la célula. Así, *in vivo*, el estado de diferenciación de la célula, junto con otros parámetros como la expresión relativa de las isoformas de los Fc γ Rs, el tipo celular, coagregación de otros receptores, etc., podrían determinar las respuestas bioquímicas y celulares inducidas en leucocitos por la unión de los complejos de IgG o por partículas opsonizadas con IgG.

VII. CONCLUSIONES

1. La diferenciación celular es un proceso continuo caracterizado por cambios fenotípicos dependientes de diversos factores.
2. Los cambios fenotípicos que se llevan a cabo en el proceso de diferenciación de las células monocíticas U-937, son dependientes del agente inductor de diferenciación.
3. Uno de los factores que influye en los cambios fenotípicos que un agente inductor de diferenciación puede causar en las células monocíticas es el estado de diferenciación celular.
4. El CD14 es un buen parámetro marcador de la diferenciación inducida por VD3 en células U-937.
5. La expresión diferencial de algunas cinasas así como su estado de activación, pueden ser importantes reguladores de la señalización celular en células en diferentes estados de diferenciación.
6. La capacidad fagocítica mediada por receptores $Fc\gamma$ en las células U-937, es dependiente de su estado de diferenciación.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Agramonte-Hevia J**, Hallal C, Garay-Canales C, Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I, Ortega Soto E, (2003) 1 α , 25-dihydroxy-vitamin D3 alters Syk activation through Fc γ RII in monocytic THP-1 cells. *J Cell Biochem.* 1;89(5):1056-76.
- Amigorena S**, Bonnerot C, Drake JR, Choquet D, Hunziker W, Guillet JG, Webster P, Sautes C, Mellman I, Fridman WH. (1992) Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science* 26:1808-1812
- Auger MJ.** y Ross JA. (1992). The biology of the macrophage. En: *The Macrophage*, Lewis CE. y McGee J.O'D. (Eds.) Oxford University Press, New York, USA. pp 1-57.
- Auwerx J**, Staels B, Van Vaeck F, Ceuppens JL, (1992) Changes in IgG Fc receptor expression induced by phorbol 12-myristate 13-acetate treatment of THP-1 monocytic leukemia cells. *Leuk Res*16(3):317-27.
- Boltz-Nitulescu G**, Willheim M, Spittler A, Leutmezer F, Tempfer C, Winkler S. (1995) Modulation of IgA, IgE, and IgG Fc receptor expression on human mononuclear phagocytes by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and cytokines. *J Leuk Biol.* 58(2):256-62
- Bonnerot, C.**, Amigorena, S., Choquet, D., Pavlovich, R., Choukroun, V., and Fridman, W.H. (1992) Role of associated γ chain in tyrosine kinase activation via murine Fc γ RIII. *EMBO J.* 11, 2747-2757.
- Botling J**, Oberg F, Törmä H, Tuohimaa P, Bläuer M, Nilsson K, (1996) Vitamin D3- and retinoic acid-induced monocytic differentiation: interactions between the endogenous vitamin D3 receptor, retinoic acid receptors, and retinoid X receptors in U-937 cells. *Cell Growth Differ.* 7(9):1239-49.
- Bruhns P**, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, Daeron M., (2008) Specificity and affinity of human Fc γ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood.* 2008
- Cambier, J.C.** (1995) New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL). *Immunol.Today* 16:110.
- Cantley LC**, Songyang Z. (1994) Specificity in recognition of phosphopeptides by src-homology 2 domains. *J Cell Sci Suppl.* 18:121-6.
- Chacko G**, Duchemin AM, Coggeshall KM, Osborne JM, Brant JT, Anderson CL. (1994) Clustering of the platelet Fc receptor induces noncovalent association with the tyrosine kinase p72 Syk. *J Biol Chem*, 269:32435-40.

- Cheng AM**, Chan AC. (1997) Protein tyrosine kinases in thymocyte development. *Curr Opin Immunol.* 9(4):528-33.
- Cheng AM**, Negishi I, Anderson SJ, Chan AC, Bolen J, Loh DY, Pawson T. (1997) The Syk and ZAP-70 SH2-containing tyrosine kinases are implicated in pre-T cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(18):9797-801.
- Clark, M.R.**, Campbell, K.S., Kazlauskas, A., Johnson, S.A., Hertz, M., Potter, T.A., Pleinman, C., and Cambier, J.C. (1992) The B cell antigen receptor complex. Association of Ig α and Ig with distinct cytoplasmic effectors. *Science* 258, 123-126.
- Clark, M.R.**, Johnson, S.A. and Cambier, J.C. (1994) Analysis of Ig α tyrosine kinase interaction reveals two levels of binding specificity and tyrosine phosphorylated Ig α stimulation of Fyn activity. *EMBO J.* 13:1911-1919.
- Crowley MT**, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, Tybulewicz VL, DeFranco AL, (1997), A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc γ receptors on macrophages, *J. Exp. Med.* 186:1027–1039.
- Daëron M, Jaeger S, Du Pasquier L, Vivier E. (2008) Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunol Rev.* 224:11-43
- D'Ambrosio, D.**, Hippen, K.L, Miskoff, S.A., Mellman, I., Pani, G., Siminovitch, K.A., and Cambier, J.C. (1995) Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by Fc γ R11b1. *Science* 268:293-297.
- Davis R.S.** , G. Dennis Jr., M.R. Odom, A.W. Gibson, R.P. Kimberly, P.D. Burrows and M.D. Cooper, (2002), Fc receptor homologs: newest members of a remarkably diverse Fc receptor gene family, *Immunol. Rev.* 190:123–136.
- DeFranco AL**, Richards JD, Blum JH, Stevens TL, Law DA, Chan VW, Datta SK, Foy SP, Hourihane SL, Gold MR. (1995) Signal transduction by the B-cell antigen receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 766:195-201.
- Denholm EM**, Stankus GP. (1995) Changes in the expression of MCP-1 receptors on monocytic THP-1 cells following differentiation to macrophages with phorbol myristate acetate. *J. Biol. Chem.* 270(5):436-40.
- Durden DL**, Liu Y. (1994) Protein-tyrosine kinase p72syk in Fc γ RI receptor signaling. *Blood* 84:2102–8.
- Ernst, L.K.**, Duchemin, A., and Anderson, C.L. (1993) Association of the high-affinity receptor for IgG (Fc γ R1) with the γ subunit of the IgE receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 90,6023-6027.

Ernst, L.K., Van Der Winkel, G.J. Chiu, I.M., Anderson, C.L. (1992) Three genes for the human high affinity Fc receptor for IgG (Fc γ RI) encode four distinct transcription product. *J. Biol. Chem.* 267, 15692-15700.

Feuerstein N, Cooper HL. (1984) Rapid phosphorylation-dephosphorylation of specific proteins induced by phorbol ester in HL-60 cells. Further characterization of the phosphorylation of 17-kilodalton and 27-kilodalton proteins in myeloid leukemic cells and human monocytes. *J Biol Chem.* 259(5):2782-8.

Fitzer-Attas CJ, Lowry M, Crowley MT, Finn AJ, Meng F, DeFranco AL, Lowell CA, (2000), Fc γ receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn, *J. Exp. Med.* 191:669–682

Ganesan LP, Ang H, Marsh CB, Susheela T. (2003) The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the phosphorylated Immunoreceptor Tyrosine-based-Activation Motif of Fc γ RIIa to modulate signalling events in myeloid cells. *J Biol Chem*, 278:35710–7.

García-García E, Rosales C (2002) Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol.* 72(6):1092-108

Ghazizadeh, S., Bolen, J.B., Fleit, H.B. (1994) Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc γ RII in monocytic THP-1 cells. *J. Biol. Chem.* 269(12):8878-84

Gomez-Mouton C, Lacalle RA, Mira E, Jimenez-Baranda S, Barber DF, Carrera AC, Martínez-A C, Mañes S (2004) Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis. *J Cell Biol* 164:759–68.

Gordon S and Taylor R. (2005) Monocyte and Macrophage heterogeneity. *Nat. Rev Immunol.* 5:953-965

Gordon S. (2002) Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3:23-35.

Hibbs, M.L., Bonadonna, L., Scott B.M., McKenzie, I.F., Hogarth, P.M.(1988) Molecular cloning of a human immunoglobulin G Fc receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 2240-2244.

Huang ZY, Hunter S, Kim MK, Indik ZK, Schreiber AD. (2003) The effect of phosphatases SHP-1 and SHIP-1 on signaling by the ITIM- and ITAM-containing Fc γ receptors Fc γ RIIB and Fc γ RIIA. *J Leukoc Biol*; 73:823–9.

Hunter, S., Huang, M.M., Indik, Z.K. and Schreiber, A.D. (1993) Fc γ RIIa-mediated phagocytosis and receptor phosphorylation in cells deficient in the protein kinase Src. *Exp. Hematol.* 21:1492-1497.

- Hutchinson, M.J.**, Harrison, P.T., Floto, R.A. and Allen, J.M. (1995) Fc γ receptors mediated phagocytosis requires tyrosine kinase activity and is ligand independent. *Eur. J. Immunol.* 25, 481-487.
- Ishiguro A**, Spirin KS, Shiohara M, Tobler A, Gombart AF, Israel MA, Norton JD, Koeffler HP (1996) ID2 expression increases with differentiation of human myeloid cells. *Blood* 87,5225-5231.
- James SY**, Williams MA, Kelsey SM, Newland AC, (1997) Colston KW. The role of vitamin D derivatives and retinoids in the differentiation of human leukaemia cells. *Biochem Pharmacol.* 54(5):625-34.
- Katagiri K**, Katagiri T, Koyama Y, Morikawa M, Yamamoto T, Yoshida T. (1991) Expression of Src family genes during monocytic differentiation of HL-60 cells. *J Immunol* 146:701–7.
- Keegan, D. K.**, and Paul, W.E. (1992) Multichain immune recognition receptors: similarities in structure and signaling pathways. *Immunol. Today* 13, 63-68.
- Kihara, H.** and Siraganian, R.P. (1994) Src homology 2 domains of Syk and Lyn bind to tyrosine-phosphorylated subunits of the high affinity IgE receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 22427-22432.
- Kinet, J.P.**, (1989) Antibody-cell interactions: Fc receptors. *Cell* 57, 351-354.
- Kolset SO**, Ivhed I, Overvatn A, Nilsson K, (1988) Differentiation-associated changes in the expression of chondroitin sulfate proteoglycan in induced U-937 cells. *Cancer Res.* 48(21):6103-8.
- Kreutz M**, Andreesen R, (1990) Induction of human monocyte to macrophage maturation in vitro by 1,25-dihydroxyvitamin D₃, *Blood.* 76(12):2457-61.
- Liao F**, Shin HS, Rhee SG, (1992) Tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 induced by cross-linking of the high-affinity or low-affinity Fc receptor for IgG in U937 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(8):3659-63
- Love P.E.** and E.W. (2000), Shores, ITAM multiplicity and thymocyte selection: how low can you go?, *Immunity* 12:591–597.
- Majeed M**, Cavegion E, Lowell CA, Berton G. (2001) Role of Src kinases and Syk in Fc γ receptor-mediated phagocytosis and phagosome-lysosome fusion. *J Leukoc Biol.*; 70:801-11.
- Malbec O**, Attal JP, Fridman WH, Daëron M., (2002) Negative regulation of mast cell proliferation by Fc γ RIIB. *Mol Immunol.* 38(16-18):1295-9

- Masuda, M.**, Verhoeven, A.J., and Roos, D.(1993) Tyrosine phosphorylation of a γ -chain homodimer associated with Fc γ RIII (CD16) in cultured human monocytes. *J. of Immunol.* 151,6382-6388.
- Matikainen S**, Hurme M. (1994) Comparison of retinoic acid and PMA as inducers of monocytic differentiation.*Int. J. Cancer* 57(1):98-103
- Matsuda M**, Park JG, Wang DC, Hunter S, Chen P, Schreiber, A.D., (1996) Abrogation of the Fc γ receptor IIA mediated phagocytosis signal by stem-loop Syk antisense oligonucleotides. *Mol Biol Cell.* 7:1095-1106.
- Mechetina L.V.**, A.M. Najakshin, B.Y. Alabyev, N.A. ChikaeV and A.V. Taranin, (2002), Identification of CD16–2, a novel mouse receptor homologous to CD16/Fc gamma RIII, *Immunogenetics* 54:463–468
- Metzger, H.** (1992) Transmembrane Signalling: The joy of aggregation. *J. of Immunol.* 149, 1477-1487.
- Nimmerjahn F.**, P. Bruhns, K. Horiuchi and J.V. (2005), Ravetch, Fc γ RIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity, *Immunity* 23:41–51.
- Oberg F**, Botling J, Nilsson K, (1993) Functional antagonism between vitamin D3 and retinoic acid in the regulation of CD14 and CD23 expression during monocytic differentiation of U-937 cells. *J Immunol.* 150(8 Pt 1):3487-95
- Ortega, E.** (1988) Possible orientational constraints determine secretory signals induced by aggregation of IgE receptors on mast cells. *EMBO J.* 7, 4101-4109.
- Ortega, E.** (1995) How does Multichain immune recognition receptors signal: A structural Hypotesis. *Mol. Immunol.* 32, 941-945.
- Ortega, S.**, Hallal-Calleros, C., Santoyo, p. (2007) Activación de leucocitos a través de receptores para inmunoglobulina G. *Mensaje Bioquímico*, XXXI: 114-130
- Parravicini V**, Gadina M, Kovarova M, Odom S, Gonzalez-Espinosa C, Furumoto Y, Saitoh S, Samelson LE, O'Shea JJ, Rivera J, (2002), Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation, *Nat. Immunol.* 3:741–748.
- Pizzo P**, Giurisato E, Bigsten A, Tassi M, Tavano R, Shaw A, Viola, A. (2004) Physiological T cell activation starts and propagates in lipid rafts. *Immunol Lett*; 91:3–9.
- Post CB**, Gaul BS, Eisenmesser EZ, Schneider ML., (1999) NMR structure of phosphotyrosine signaling complexes. *Med Res Rev.* 19(4):295-305.
- Raeder EM**, Mansfield PJ, Hinkoyska-Galcheva V, Shayman JA, Boxer LA. (1999) Syk activation initiates downstream signaling events during human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis. *J Immunol.*; 163:6785-93.

Rankin BM, Yocum SA, Mittler RS, Kiener PA, (1993) Stimulation of tyrosine phosphorylation and calcium mobilization by Fc gamma receptor cross-linking. Regulation by the phosphotyrosine phosphatase CD45. *J Immunol.* 150(2):605-16.

Ravetch J.V. and S. Bolland, (2001) IgG Fc receptors, *Annu. Rev. Immunol.* 19:275–290

Ravetch, J.V., and Anderson, C.L. (1990) Fc γ R family: Proteins, transcripts and genes. In *Fc Receptors and the action of antibodies* (H. Metzger) American Society for Microbiology, Washington, D.C. 211-235.

Reth, M. (1989) Antigen receptor tail clue. *Nature (London)* 338, 383-384.

Sanchez-Mejorada, G., and Rosales, C. (1998) Signal Transduction by Immunoglobulin Fc receptors. *J.Leuk.Biol.*63,521-533.

Santana, C., et.al. (1996) Protein tyrosine phosphorylation in leukocyte activation through receptors for IgG. *J.Leuk.Biol.*60 (4):433-440.

Sarkar S, Schlottmann K, Cooney D, Coggeshall KM, (1996) Negative signaling via Fc γ RIIB1 in B cells blocks phospholipase C γ 2 tyrosine phosphorylation but not Syk or Lyn activation. *J Biol Chem.* 271(33):20182-6.

Scholl PR, Ahern D, Geha RS, (1992) Protein tyrosine phosphorylation induced via the IgG receptors Fc gamma R1 and Fc gamma R2 in the human monocytic cell line THP-1. *J Immunol.* 149(5):1751-7.

Schweitzer-Stenner, R., Ortega, E. And Petch, I. (1991) Kinetics of Fc ϵ RI dimer formation by specific monoclonal antibodies and mast cells. *Biochemistry* 33: 8813.

Schweitzer-Stenner, R., Ortega, E. And Petch, I. (1991) Kinetics of Fc ϵ RI dimer formation by specific monoclonal antibodies and mast cells. *Biochemistry* 33: 8813.

Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P. (1996) Differences in the state of differentiation of thp-1 cells induced by phorbol ester and 1,25 dihydroxyvitamin D3. *J. Leukoc. Biol.* 59(4):555-561.

Segal, D.M. (1990) Antibody-mediated killing by leukocytes. In *Fc receptors and the action of antibodies*, H. Metzger, ed. (Washington D.C.:American Society for Microbiology), pp.291-301.

Sharma P, Varma R, Sarasij RC, Ira, Gousset K, Krishnamoorthy G, et al. (2004) Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell* 116:577–89.

Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ (1993) SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences *Cell* 72(5): 767-778.

Suzuki T, Kono H, Hirose N, Okada N, Yamamoto K, Honda Z. (2000) Differential involvement of Src family kinases in Fc_γ receptor mediated phagocytosis. *J Immunol* 65:473.

Taimi M, Chateau MT, Marti J, Pacaud M (1990) Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U937 in the absence of vimentin expression. *Differentiation* 45:55-60.

Testa U, Masciulli R, Tritarelli E, Pustorino R, Mariani G, Martucci R, Barberi T, Camagna A, Valtieri M, Peschle C, (1993) Transforming growth factor-beta potentiates vitamin D3-induced terminal monocytic differentiation of human leukemic cell lines. *J Immunol.* 150(6):2418-30.

Turner M, Schweighoffer E, Colucci F, Di Santo JP, Tybulewicz VL. (2000) Tyrosine kinase Syk: essential functions for immunoreceptor signaling. *Immunol Today.* 21:148-54.

van Oers NS, Weiss A. (1995) The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signaling processes. *Semin Immunol.* 7:227-36.

Wang AV, Scholl PR, Geha RS. (1994) Physical and functional association of the high affinity immunoglobulin G receptor (Fc_γRI) with the kinases Hck and Lyn. *J Exp Med* 180:1165–70.

Weinshank, R.L., Luster, A.D., Ravetch, J.V. (1988) Function and regulation of a murine macrophage-specific IgG Fc receptor, Fc gamma R-alpha. *J Exp Med.* 167(6):1909-25.

Yanagi S, Inatome R, Takano T, Yamamura H., (2001) Syk expression and novel function in a wide variety of tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 288(3):495-8.

Syk and Lyn phosphorylation induced by Fc γ RI and Fc γ RII crosslinking is determined by the differentiation state of U-937 monocytic cells

Claudia Hallal-Calleros^a, José Agramonte-Hevia^a, Claudia Garay-Canales^a, Janet M. Oliver^d, Cristhian Guerra-Araiza^b, David Heras^a, Ignacio Camacho-Arroyo^b, Isabel Soto-Cruz^c, Enrique Ortega^{a,*}

^a Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México – UNAM, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., Mexico

^b Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., Mexico

^c FES Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., Mexico

^d Department of Pathology and Cancer Research and Treatment Center, University of New Mexico, Albuquerque, NM, USA

Received 29 July 2004; received in revised form 16 December 2004; accepted 15 February 2005

Available online 17 March 2005

Abstract

Fc γ receptor (Fc γ R)-mediated phagocytosis by mononuclear phagocytes is an essential function in host defense. This process is initiated by crosslinking of membrane Fc γ Rs, which induces phosphorylation and activation of Src and Syk tyrosine kinases. Activation of these enzymes is essential for initiating the biochemical cascade that results in the cytoskeletal and membrane changes involved in phagocytosis. Phagocytic capacity and other effector functions of mononuclear phagocytes change during differentiation/maturation of these cells. This is a complex process governed by different soluble and micro-environmental factors, giving rise to populations of cells with distinct phenotypic characteristics. Several agents, including calcitriol, have been shown to induce in vitro differentiation-related phenotypic changes in monocytic cell lines. In this paper, we characterized the changes in the initial biochemical signals associated with the increase in Fc γ R-mediated phagocytosis induced by calcitriol in monocytic U-937 cells. The 10-fold increase in phagocytic capacity is not accompanied by an increase in Fc γ R expression. However, the phosphorylation levels of Lyn and Syk after Fc γ RI or Fc γ RII crosslinking are increased after calcitriol treatment. Our results suggest that signaling induced by Fc γ R in mononuclear phagocytes is not only dependent on the quantity of Fc γ Rs aggregated by a stimulus, but it is highly dependent on the cell's differentiation state.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Fc receptors; Lyn; Syk; Monocyte differentiation; Signal transduction

1. Introduction

Membrane receptors for the Fc portion of immunoglobulin G (Fc γ R) are a family of membrane molecules expressed on most leukocytes. Crosslinking of Fc γ Rs by antigen–antibody complexes or opsonized particles triggers various responses such as phagocytosis, release of pro-inflammatory molecules, cytokine production and antibody-mediated cell cytotoxicity.

Three distinct classes of Fc γ Rs (Fc γ RI, Fc γ RII and Fc γ RIII) are recognized, based on their affinity for IgG, protein and gene structure, and cell distribution. Each class of Fc γ Rs consists of several individual receptor isoforms (reviewed in [1]). Human Fc γ RI (CD64) is expressed on monocytes and macrophages as a heterotrimer comprising an α subunit non-covalently associated to a pair of disulfide-linked Fc γ chains. The α subunit contains the IgG binding site, while each γ chain contains a consensus Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM) essential for cellular activation [1,2]. Three human Fc γ RII genes (A, B and C) encode monomers (CD32) with almost identical extracellular

* Corresponding author. Tel.: +52 5622 3834; fax: +52 5622 3369.

E-mail address: ortsoto@servidor.unam.mx (E. Ortega).

IgG binding domains, a single transmembrane domain and distinct cytoplasmic tails. Fc γ RII isoforms A and C contain in their cytoplasmic domain activating ITAM motifs, while Fc γ RII B contain inhibitory ITIM motifs. Fc γ RIIa and Fc γ RIIc are expressed on monocytes, macrophages, granulocytes, platelets and NK cells, while Fc γ RIIb is expressed on monocytes, T cells and B cells [3,4]. Fc γ RIII (CD16) has two isoforms: the A isoform is a transmembrane protein expressed in macrophages associated to a pair of ITAM-containing Fc γ R chains. The Fc γ RIIIb isoform, expressed exclusively on neutrophils, is anchored to the cell membrane by a GPI linkage, and lacks transmembrane and cytoplasmic domains.

The activatory Fc γ Rs (Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIA) share a similar mechanism of signal transduction on monocytic cells: clustering of activatory Fc γ Rs induces the immediate phosphorylation of ITAM tyrosines, usually catalyzed by the Src family tyrosine kinase Lyn [3,5,6]. The tyrosine-phosphorylated ITAMs serve as binding sites for the SH2 domains of the tyrosine kinase Syk. Binding to phosphorylated ITAM results in activation of Syk catalytic activity, enabling it to phosphorylate downstream signaling proteins [6–10]. The essential role of Syk in connecting early Fc γ R signaling to effector functions has been demonstrated by several approaches, which have unequivocally shown that Syk kinase activation is necessary for all the studied responses mediated through Fc γ Rs [9]. Thus, Fc γ R mediated phagocytosis is inhibited by the Syk specific inhibitor piceatannol [11,12], and by inhibition of Syk expression by antisense oligonucleotides [13]. It has also been shown that macrophages from Syk^{-/-} mice are unable to internalize IgG-opsonized particles [14].

Monocytes leave the bloodstream and enter tissues where they differentiate into macrophages. During this process, monocytic cells undergo several phenotypic changes that increase some capabilities while down-regulate others [15]. Monocytic cell lines can be induced to differentiate in vitro by several agents, including the active metabolite of Vitamin D3 (1 α ,25-di-hydroxy-Vitamin D3 or calcitriol). Differentiation of U-937 cells with calcitriol has been reported to modify the expression of complement receptor type 3 (CR3) and to mediate an increase in the number of the cell's IgG-binding sites and an increase in the phagocytosis of IgG-opsonized particles [16]. In order to explore the biochemical basis of the differentiation-related increase in Fc γ R-mediated phagocytosis, we have comparatively examined the expression level of Fc γ Rs isoforms, as well as the activation of Lyn and Syk kinases in response to Fc γ R crosslinking in U-937 monocytic cells before and after calcitriol-induced differentiation. We found that in U-937 cells calcitriol induced a 10-fold increase in Fc γ R-mediated phagocytosis that is not accompanied by a similar increase in Fc γ R expression. The levels of Lyn and Syk phosphorylation induced by Fc γ R crosslinking are increased, and while Syk expression is not modified, Lyn expression is higher after differentiation. These results show that Lyn and Syk are differently regulated in monocytic cells

in distinct states of maturation. Our data demonstrate that signaling through a single class of Fc γ R can vary depending not only on the magnitude of the stimulus but also on the differentiation state of the cell.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

1 α ,25-Di-hydroxy-Vitamin D3 (VD3) was from Calbiochem (La Jolla, CA). Protein A agarose was from GIBCO Laboratories (Grand Island, NY). Anti-phosphotyrosine (PY20-HRP), anti-Syk (LR) and anti-Lyn (Lyn 44) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). Anti-Lyn monoclonal antibody (mAb) was from Transduction Laboratories. Fab fragments of the 32.2 (anti-Fc γ RI) and IV.3 (anti-Fc γ RII) mAbs were obtained in our laboratory from the purified antibodies using immobilized ficin for 32.2 or immobilized pepsin (Pierce, Rockford, IL) for IV.3, following the manufacturer's instructions. Secondary anti-rabbit IgG-HRP and anti-mouse IgG (Fab')₂ fragments were purchased from Jackson ImmunoResearch (Amish, PA). Reagents for RNA isolation and RT-PCR were from GIBCO-BRL, Inc. (Gaithersburg, MD) and Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO). Taq DNA polymerase was purchased from Perkin-Elmer (Branchburg, NJ).

2.2. Cell culture and in vitro differentiation

U-937 cells (obtained from ATCC) were grown in RPMI 1640 medium with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 0.1 mM non-essential amino acids, 0.1 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. Cultures were maintained in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C. Differentiation was induced by culturing (0.5–1) \times 10⁶ cells/ml with 100 nM calcitriol for 72 h. After treatment, adherent cells were detached by gently pipetting and both adherent and non-adherent cells were used for experiments.

Hybridomas producing the 32.2 and IV.3 mAbs were obtained from ATCC. Antibody was purified from culture supernatants by chromatography in protein A agarose (IV.3) or protein G agarose (32.2) columns.

2.3. Flow cytometry

For flow cytometry, 1 \times 10⁶ U-937 cells/ml were incubated in PBS-5% FBS with 10 μ g/ml of specific antibodies: IV.3 (anti-Fc γ RII), 32.2 (anti-Fc γ RI), 3G8 (anti-Fc γ RIII), UCHM-1 (anti-CD14), 2LMP19c (anti-CD11b), or an isotype-matched control antibody, for 60 min at 4 °C. Cells were washed three times with the same buffer and stained with 200 μ l of a 1:200 dilution of a rabbit anti-mouse IgG coupled to FITC (Zymed, San Francisco, CA). After washing, cells were fixed with 1% paraformaldehyde (PFA) for

25 min and washed again with PBS. Fluorescence intensity was measured by flow cytometry (FACScan cytometer, Becton Dickinson, San José, CA).

2.4. Preparation of IgG-opsonized sheep RBC

One milliliter of packed sheep red blood cells (SRBC) preserved in Alsever's solution were washed with DGVB²⁺ buffer (2.5 mM Veronal, 75 mM NaCl, 2.5% dextrose, 0.05% gelatin, 0.15 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, pH 7.5) and incubated with 12.44 mg of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid in 7 ml of borate buffer for 10 min at RT. The sensitized SRBC were washed two times with DGVB²⁺ and suspended in RPMI at 2% (v/v). To determine the hemagglutination titer, 50 µl of 1:2 serial dilutions of rabbit polyclonal anti-DNP antibodies were mixed with 50 µl of the 2% SRBC suspension in V-bottom microwells and incubated for 90 min at RT. The hemagglutination titer was determined as the lowest concentration of antibody capable of producing macroscopic SRBC agglutination. Sensitized red blood cells were opsonized by incubation with sub-hemagglutinating concentration of rabbit anti-DNP antibodies for 1 h at RT with gentle shaking. The SRBC were washed to remove unbound antibody and suspended in RPMI at 1% for phagocytosis.

2.5. Phagocytosis assay

Sixty microliters of 1% IgG-opsonized SRBC were added to 1×10^6 U-937 cells (untreated or treated with calcitriol) in 320 µl of RPMI, and cells were pelleted by low speed centrifugation to increase contact between SRBC and phagocytes. The samples were prepared in duplicate and incubated for 90 min at 37 °C and 5% CO₂ to allow optimum phagocytosis. Cells were subjected to brief hypotonic lysis with 1 ml of ammonium chloride to eliminate non-ingested SRBC and rinsed once with 1 ml of the same solution to remove free hemoglobin. As control, cells were incubated with SRBC that were not opsonized with IgG. After washing, the cells were lysed with 320 µl of 0.3% SDS and phagocytosis was estimated by the colorimetric Jungi's method, based on the pseudoperoxidase activity of hemoglobin, using 3,3'-diaminobenzidine plus H₂O₂ as a substrate. The amount of reduced diaminobenzidine was determined by absorbance at 470 nm [17].

2.6. Cell stimulation and immunoprecipitation

Fifteen million U-937 cells were suspended in 1 ml of RPMI supplemented with 3% FBS and incubated with 10 µg of Fab fragments of the corresponding primary anti-FcγRI or anti-FcγRII mAbs for 10 min at 4 °C. The supernatant was discarded and the cells were suspended again in 1 ml of cold RPMI. Eighty micrograms of anti-mouse IgG (Fab')₂ antibody were added and the tubes transferred to 37 °C for the indicated times. Cells were lysed (15 min at 4 °C) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM NaF,

1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 1 µg/ml aprotinin and 1% Triton X-100. Insoluble material was pelleted (15,000 × g for 15 min) at 4 °C. Cell lysates were incubated 3 h at 4 °C with the corresponding antibody coupled to protein A agarose. The immune complexes were washed three times with cold washing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 1 µg/ml aprotinin and 0.1% Triton X-100), and subjected to SDS-PAGE.

2.7. SDS-PAGE and immunoblotting

Immunoprecipitates or total cell lysates were boiled in reducing Laemmli sample buffer, separated by SDS-PAGE (10% acrylamide) and electroblotted onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked overnight in TBST buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5% Tween 20) containing 1% BSA for anti-kinases blot and 1% BSA with 3% dry milk for anti-PY blot. For immunodetection of proteins, membranes were subjected to immunoblotting with 1 µg/ml of mouse anti-phosphotyrosine PY20 coupled to horseradish peroxidase for 1 h at RT, or with 1 µg/ml of anti-kinase polyclonal antibodies followed by HRP-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG (diluted 1:10,000) for 30 min at RT. Next, the membranes were washed five times in TBST and the bands were visualized using ECL system according to the manufacturer's instructions (Super Signal ECL, Pierce). For stripping, membranes were incubated in 0.1 M glycine, pH 2.5 and SDS 0.05% for 1 h at 60 °C. After washing, the membranes were blocked again, incubated with the corresponding antibodies and processed as described above. Chemiluminescent signals were captured in Kodak Bio-Max film, and the bands were quantitatively analyzed from digitized images captured from the films with the Gel-Doc system (BioRad, Richmond, CA), using the BioRad Quantity One software.

2.8. RNA isolation and RT-PCR

RNA isolation and RT-PCR were as described in [18]. Briefly, total RNA was isolated from differentiated or undifferentiated U-937 cells by the single step method based on guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform extraction using TRIzol (GIBCO-BRL, Inc.). Total RNA was reverse transcribed and 10 µl of reaction were subjected to PCR using primer pairs designed to specifically amplify FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC or β-actin genes (control). For the PCR reaction, after the initial denaturation step at 95 °C for 5 min, 30 amplification cycles were carried out. The number of cycles performed was within the exponential phase. Twenty-five microliters of PCR product were separated on 2% agarose gels and stained with ethidium bromide. The images were captured under UV transillumination on type 665 negative film (Polaroid Co., Cambridge, MA).

2.9. Data analysis

Phagocytosis and cytofluorometry data are displayed as percentages where values obtained from U-937 cells not treated with calcitriol were assigned a value of 100%.

Semi-quantitative estimation of protein levels for Syk and Lyn, and mRNA level for each Fc γ R isoform were obtained by quantifying the intensity of the bands using the Gel-Doc System (BioRad) and the Quantity One software. Statistical significance of the data was evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Student's *t*-test; $P < 0.05$ was considered statistically significant. Results are expressed as mean \pm S.D. from at least three independent experiments.

3. Results

3.1. Calcitriol induces *in vitro* differentiation of U-937 cells

Differentiation of monocytic cell lines towards a macrophage-like phenotype includes several changes, such as a higher phagocytic capacity and changes in the expression of some surface molecules like CD14 and CR3. U-937 cells normally grow as single-cell suspension. Treatment of U-937 cells for 72 h with 100 nM calcitriol induced cells' adherence to each other and adhesion of about 30% of the cells to the culture dish (Fig. 1A). Also, cell proliferation diminished about 30%, as estimated by cell counting under the microscope (not shown). We analyzed by indirect immunofluorescence

and cytometry the changes induced by calcitriol in the expression of CR3 and CD14. In each experiment, the mean fluorescence intensity obtained from non-treated U-937 cells was assigned a value of 100% and the corresponding values obtained for treated cells were expressed as percentage of the mean of fluorescence intensity of control cells (relative expression) (Fig. 1B). Calcitriol induced a time-dependent increase in the expression of both membrane markers. After 72 h with calcitriol, we found a statistically significant four-fold increase in CR3 expression and a ninefold increase in CD14 expression.

3.2. Calcitriol-induced differentiation causes a 10-fold increase in Fc γ receptor mediated phagocytosis

We determined the phagocytosis of SRBC opsonized with IgG by U-937 cells before and after treatment with calcitriol. Treatment with 100 nM calcitriol induces a time dependent increase in the Fc γ R-mediated phagocytic activity, reaching an increase of more than 10-fold at 72 h (Fig. 2A).

To determine if the significant increase in phagocytosis induced by calcitriol was related to an increase in membrane expression of Fc γ Rs, we analyzed the expression of surface Fc γ Rs by cytofluorometry in U-937 cells before and after calcitriol treatment for different times (24, 48 and 72 h), using specific mAbs: anti-Fc γ RI (32.2), anti-Fc γ RII (IV.3) or anti-Fc γ RIII (3G8). We found a statistically significant increase of about 50% in both Fc γ RI and Fc γ RII at 72 h (Fig. 2B). Although both receptors reach a similar increment at 72 h, the time course of the increase is different. While Fc γ RI increase is detected at 48 h and sustained up to 72 h, Fc γ RII barely

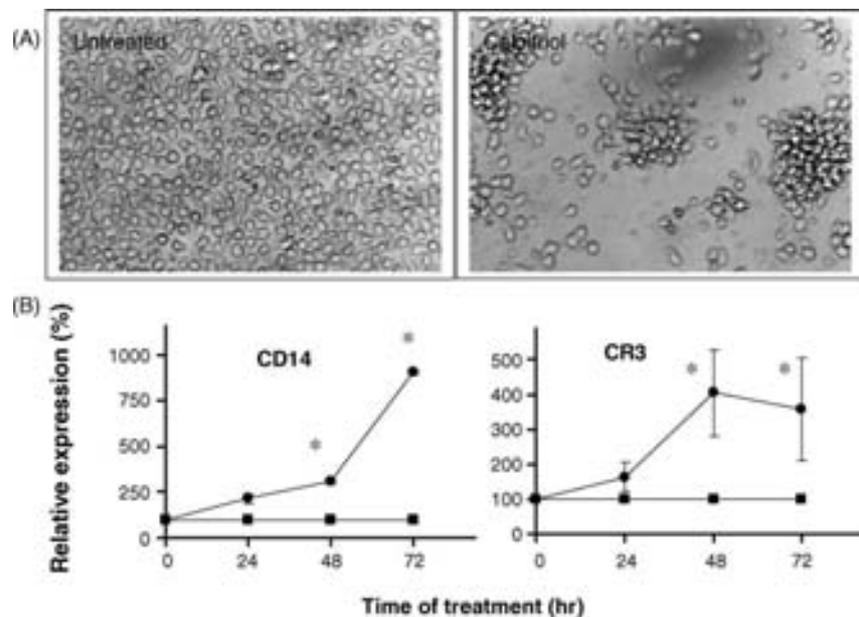


Fig. 1. Calcitriol induces differentiation-related changes in U-937 cells. U-937 cells were incubated with 100 nM calcitriol for the indicated times. (A) Microscopic phase contrast images show cell morphological changes after 72 h. (B) Effect of calcitriol on the expression of CD14 and CR3. Data are expressed as the percentage of the mean in fluorescence intensity obtained from treated cells with respect to non-treated cells. The mean \pm S.D. of the normalized data obtained from three independent experiments is shown. Similar results were obtained after calcitriol treatment in several experiments during this study.

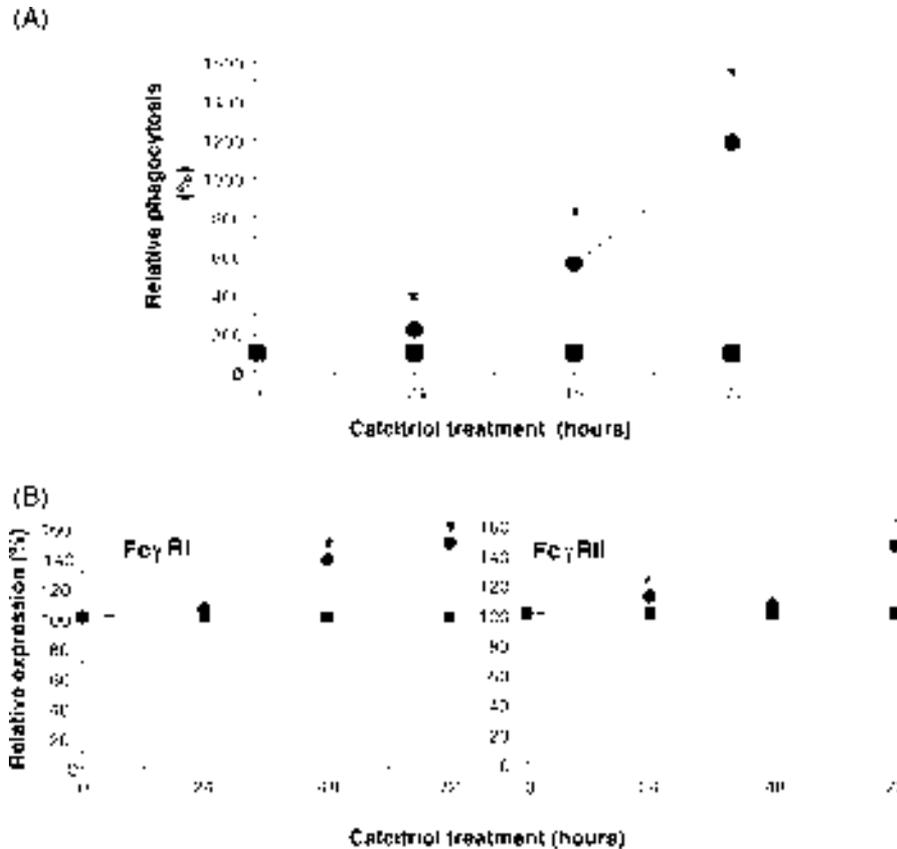


Fig. 2. Calcitriol induces a 10-fold increase in the FcγR mediated phagocytosis without a corresponding increase in Fcγ receptor. (A) U-937 cells non-treated (■) or treated (●) with calcitriol (100 nM) for the indicated times were incubated with IgG-opsonized SRBC for 90 min at 37 °C. Non-ingested SRBC were lysed and after rinsing, phagocytosis was evaluated by the pseudoperoxidase activity of hemoglobin. In each experiment, the relative phagocytosis was calculated as the phagocytosis obtained from calcitriol treated cells with respect to non-treated cells (taken as 100%). The graph shows the mean ± S.D. obtained from three independent experiments. (B) FcγRI and FcγRII expression in U-937 cells before (■) or after (●) calcitriol treatment was determined by indirect immunofluorescence using the specific antibodies 32.2 (anti-FcγRI) and IV.3 (anti-FcγRII). The relative expression was obtained from the mean fluorescence intensity of calcitriol treated cells with respect to the mean fluorescence intensity of untreated cells (taken as 100%). Graphs show the mean ± S.D. obtained from three independent experiments.

changes in the first 48 h with a noticeable increase shown only at 72 h. U-937 cells do not express FcγRIII constitutively, and we did not detect surface expression of this receptor after VD3 treatment (not shown).

Given the high homology in the extracellular portions of different isoforms of FcγRII, the anti-FcγRII mAb IV.3 does not distinguish between activating (FcγRIIa and FcγRIIc) and inhibitory (FcγRIIb) isoforms. Therefore, we used a semiquantitative RT-PCR to determine if calcitriol modifies the relative expression of FcγRII activatory/inhibitory isoforms.

The primers pairs used to specifically amplify the cDNA for human FcγRI, FcγRIIa1 and Ila2, FcγRIIb1 and I Ib2, FcγRIIc, and β-actin, were reported in [18]. Results of a representative experiment are shown in Fig. 3A. RT-PCR using the primers specific for FcγRI showed a band of 439 bp corresponding to the FcγRIα transcript. With the primers used for amplifying FcγRIIa mRNA, two PCR products of 441 and 317 bp, corresponding to FcγRIIa1 and FcγRIIa2 transcripts were observed. Two products of 582 and 520 bp corresponding to FcγRIIb1 and FcγRIIb2 were obtained with

the primers specific for FcγRIIb. With the primers specific for FcγRIIc, we observed one band of 377 bp corresponding to FcγRIIc. Densitometric intensities of the respective bands were normalized with respect to the intensity of the band used as internal control (actin). Combined data from three different experiments showed no significant calcitriol-induced changes in the expression level of any of the FcγR transcripts analyzed (Fig. 3B).

These data demonstrate that the calcitriol-induced increase in Fcγ receptor mediated phagocytosis is not linked to a significant variation in the expression of different FcγRs isoforms.

3.3. Calcitriol-induced differentiation increases FcγR mediated Syk activation

Syk kinase activation is essential for functional responses mediated through Fcγ receptors, including phagocytosis. Fig. 4 shows that FcγRI or FcγRII crosslinking in U-937 cells induces a time-dependent increase in Syk phosphorylation, which reaches a maximum at 3 min. In time-course studies

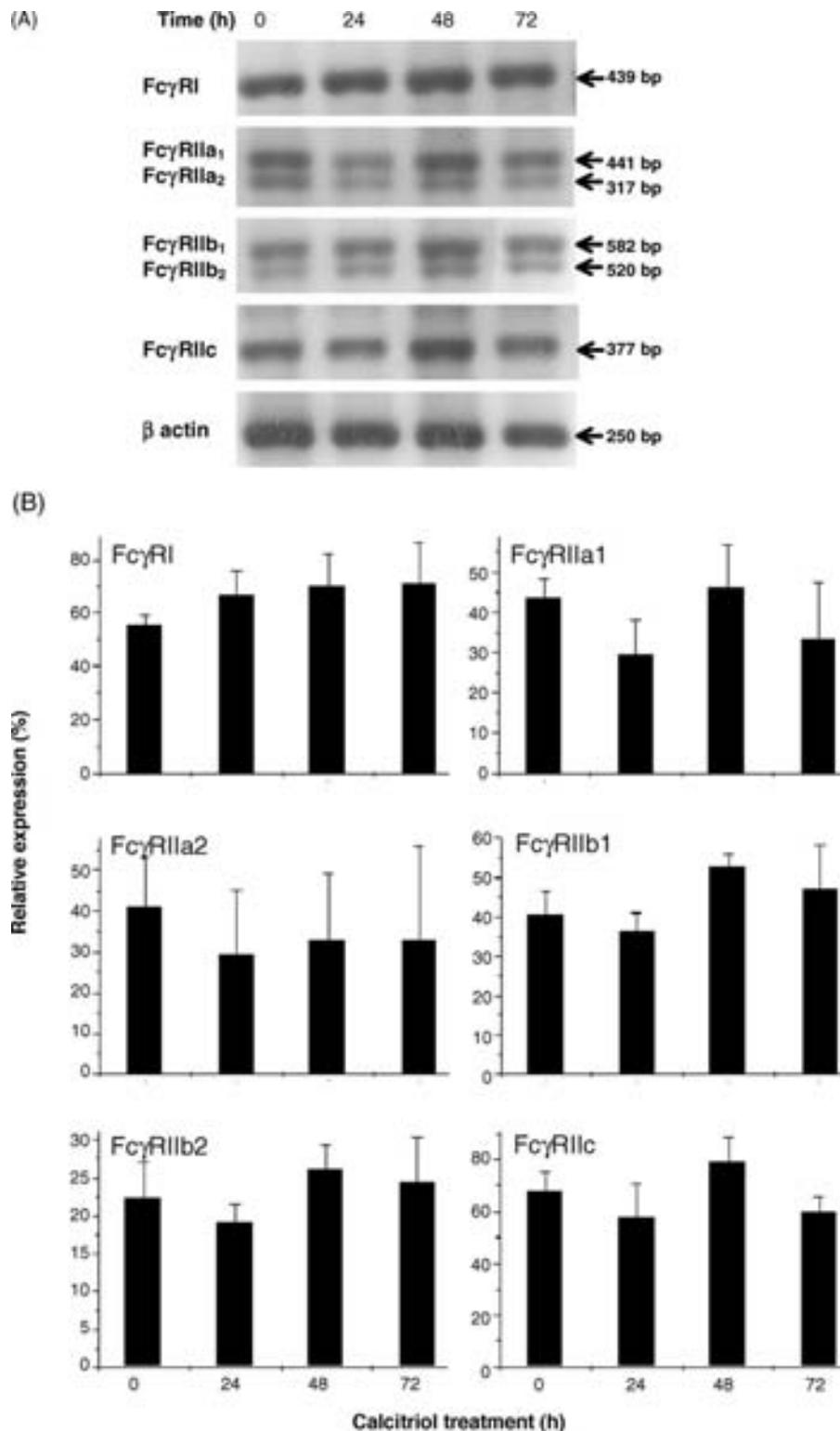


Fig. 3. Calcitriol did not affect the levels of mRNA for Fc γ R isoforms. U-937 cells were treated with calcitriol for different times, or left untreated. RNA was isolated and reverse transcribed and amplified by PCR using with specific primers corresponding to Fc γ RI, or Fc γ RII A, B, or C isoforms, and β -actin as control. The products of the PCR reaction were analyzed on agarose gels containing ethidium bromide. (A) Specific bands of the expected sizes for each primer pair are indicated. (B) Relative expression levels of Fc γ R isoform-specific transcripts were obtained after normalization of the densitometric value of the band corresponding to each isoform with respect to the intensity of the band corresponding to actin mRNA. Mean \pm S.D. of three independent experiments.

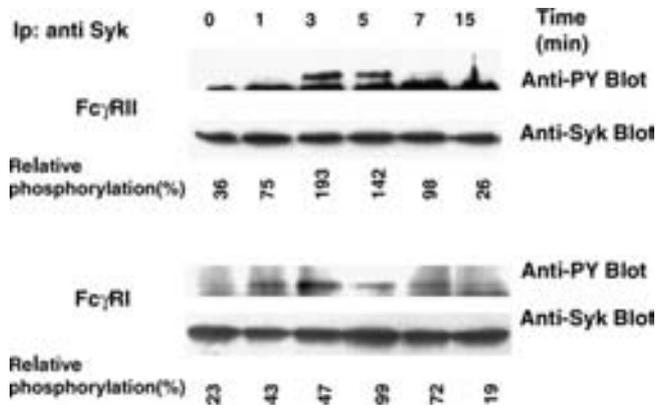


Fig. 4. Kinetics of Syk tyrosine phosphorylation induced by Fc γ RI or Fc γ RII crosslinking. 15×10^6 U-937 cells were incubated with $10 \mu\text{g/ml}$ of Fab fragments of anti-Fc γ RI or anti-Fc γ RII monoclonal antibodies for 3 min. The unbound anti-receptor antibodies were washed away and the cells were incubated with $80 \mu\text{g/ml}$ of anti-mouse (Fab')₂ fragments for the indicated times at 37°C . Cells were lysed with 1% Triton X-100 and supernatants were incubated for 3 h with LR anti-Syk antibodies previously bound to protein A agarose beads. After rinsing, beads were boiled in Laemmli sample buffer and run in SDS-PAGE. The resolved proteins were electrotransferred to nitrocellulose paper and incubated with anti-PY antibodies. Tyrosine phosphorylated bands were visualized by chemiluminescence (anti-PY blots). The antibodies were eluted and the blot was re-probed with anti-Syk antibodies. Representative of three independent experiments.

using calcitriol-treated cells we also observed the maximum phosphorylation level of Syk at 3 min (not shown).

To analyze the effect of calcitriol-induced differentiation on Syk phosphorylation induced by Fc γ R crosslinking, calcitriol-treated and untreated cells were stimulated through Fc γ RI or Fc γ RII with saturating amounts of specific antibodies and a secondary antibody, for 3 min. After lysis and removal of insoluble material, Syk was immunoprecipitated and its phosphorylation level was analyzed by anti-phosphotyrosine immunoblotting. The blot was stripped and re-probed with anti-Syk antibodies. A representative experiment is shown in Fig. 5A. The intensity of both the anti-PY and the anti-Syk signals from each individual band was determined densitometrically, and the ratio of the anti-PY to the anti-Syk intensities was calculated (relative phosphorylation). Fig. 5B presents the combined data of five independent experiments. Tyrosine phosphorylation of Syk induced by either Fc γ RI or Fc γ RII crosslinking increases about 2.5-fold after treatment with calcitriol. There were no significant differences between Syk phosphorylation levels induced by Fc γ RI versus Fc γ RII, neither in untreated, or in calcitriol-treated U-937 cells.

3.4. Effect of calcitriol on the expression of Syk and Lyn kinases

In the anti-Syk blot (Fig. 5A, lower panel and similar experiments), we observed a similar quantity of Syk protein in immunoprecipitates from treated and non-treated cells. However, the possibility exists that differentiation-induced

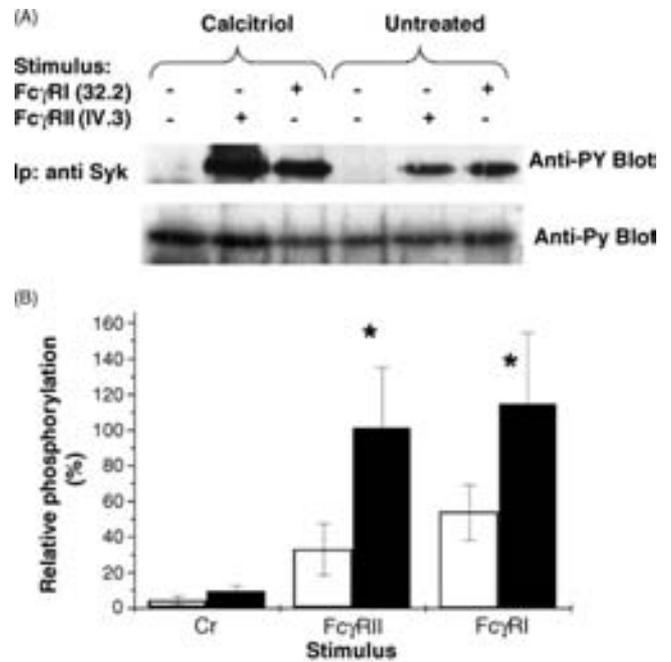


Fig. 5. Syk phosphorylation level increases after calcitriol. (A) 15×10^6 U-937 cells untreated or treated with 100 nM calcitriol for 72 h were incubated with $10 \mu\text{g/ml}$ of Fab fragments from anti-Fc γ RI or anti-Fc γ RII monoclonal antibodies, for 3 min at 4°C , rinsed and incubated with $80 \mu\text{g/ml}$ of anti-mouse (Fab')₂ fragments for 3 min at 37°C . Cells were lysed with 1% Triton X-100 containing proteases and phosphatases inhibitors. Post-nuclear supernatants were incubated for 3 h with LR anti-Syk antibodies previously bound to agarose beads. After rinsing, beads were boiled in Laemmli sample buffer and run in SDS-PAGE. The gel was transferred and blotted with anti-PY antibodies and developed with the ECL system (upper panel). The antibodies were eluted and the blot was re-probed with anti-Syk antibodies (lower panel). (B) Densitometric intensities of the bands were obtained and the relative phosphorylation was calculated as the ratio of the PY signal over Syk signal. Empty bars: untreated cells, solid bars: calcitriol-treated cells. Mean \pm S.D. of five independent experiments.

changes in the amount of Syk were not detected because the immunoprecipitating anti-Syk antibodies were limiting in the immunoprecipitation assay. To directly examine if calcitriol induces changes in the levels of Syk and Lyn kinases, we compared the amount of immuno-detectable kinases in whole cell lysates by immunoblot with kinase-specific antibodies. Total lysates from different numbers of treated and untreated cells were resolved in SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose and blotted with anti-Syk antibodies (Fig. 6 upper panel) and, after stripping, with anti-Lyn antibodies (middle panel). After stripping again, the blot was re-probed with anti-actin antibodies to ensure that the amounts of cellular proteins in each lane correlated with number of cells (Fig. 6 lower panel). The expression of Syk was not modified, as the intensity of the bands corresponding to Syk and actin in treated versus untreated cells are equal for equal number of cells (compare lanes 1 versus 4, 2 versus 5 and 3 versus 6). In contrast, calcitriol treatment induces a 2.5-fold increase in Lyn expression.

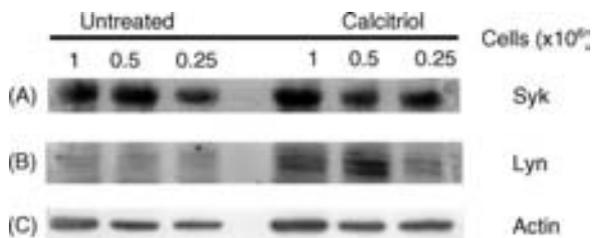


Fig. 6. Calcitriol induces an increase in cellular Lyn but not in cellular Syk. U-937 cells non-treated or treated with 100 nM calcitriol for 72 h were lysed in RIPA buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5% Na deoxycolate, 0.1% SDS) and different number of cells (as indicated) were run in SDS-PAGE. After transferring to nitrocellulose (A) Syk, (B) Lyn and (C) actin, were detected by immunoblotting using polyclonal specific antibodies. A representative experiment out of three independent experiments is shown.

3.5. Lyn phosphorylation by FcγR crosslinking increases significantly after calcitriol-induced differentiation

In the experiments described above, calcitriol induced both an increase in the expression level of Lyn as well as an increase in tyrosine phosphorylation level of Syk, both of them by a factor of 2.5. To determine if the higher phosphorylation of Syk in calcitriol treated cells is only due to the increase in total cellular Lyn, or if in differentiated cells FcγR crosslinking is a more potent inducer of Lyn phosphorylation, we performed experiments comparing the level of phosphorylation of similar amounts of Lyn between treated and untreated cells.

Calcitriol treated or untreated U-937 cells were stimulated by FcγRI or FcγRII crosslinking. Equal amounts of Lyn were immunoprecipitated with equal and limiting amount of anti-Lyn antibodies, and the level of Lyn phosphorylation was determined by anti-phosphotyrosine blot. Equal amount of Lyn in each lane was verified by stripping the blot and performing anti-Lyn blot. The ratio of the densitometric intensities of the anti-PY signal to the anti-Lyn signal was calculated (relative phosphorylation). Fig. 7A shows a representative experiment and Fig. 7B shows the combined data from three independent experiments. In undifferentiated U-937 cells we barely detected an increase in Lyn phosphorylation after FcγR crosslinking (43% in unstimulated cells, 52% in FcγRII stimulated and 58% in FcγRI stimulated cells). Under the same conditions of stimulation, after anti-PY immunoprecipitation and anti-Lyn blot we observed an increase in FcγR mediated Lyn stimulation, reproducing the previous observation of an increase in Lyn phosphorylation after FcγR crosslinking [6]. In calcitriol-treated cells, the basal level of Lyn phosphorylation increases three times compared to untreated cells. After stimulation by FcγRI or FcγRII crosslinking, there was a sixfold increase in the level of Lyn phosphorylation. Since the increase in FcγRI and FcγRII expression induced by calcitriol was much smaller, these findings suggest that in calcitriol-treated cells, FcγR aggregates are more efficient in promoting Lyn phosphorylation. We found no differ-

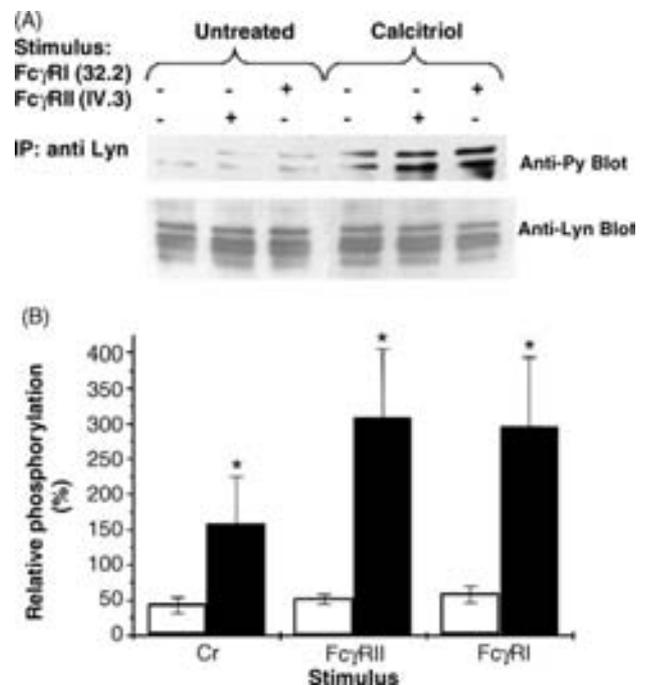


Fig. 7. Lyn phosphorylation level increases after calcitriol. (A) 15×10^6 U-937 cells untreated or treated with 100 nM calcitriol for 72 h were incubated with 10 μ g/ml of Fab fragments of anti-FcγRI or anti-FcγRII monoclonal antibodies for 3 min at 4 °C, rinsed and incubated with 80 μ g/ml of anti-mouse (Fab')₂ fragments for 3 min at 37 °C. Cells were lysed with 1% Triton X-100 containing proteases and phosphatases inhibitors. Post-nuclear supernatants were incubated for 3 h with Lyn44 polyclonal antibodies previously bound to agarose beads. After rinsing, beads were boiled in Laemmli sample buffer and run in SDS-PAGE. The gel was transferred and blotted with anti-PY antibodies and developed with the ECL system (upper panel). The antibodies were eluted and the blot was re-probed with anti-Lyn monoclonal antibodies (lower panel). (B) Densitometric intensities of the bands were obtained and the relative phosphorylation was calculated as the ratio of the anti-PY signal over the anti-Lyn signal. Empty bars: untreated cells, solid bars: calcitriol-treated cells. The graph shows the average \pm S.D. of four independent experiments.

ences between FcγRI or FcγRII induced phosphorylation of Lyn.

4. Discussion

Although a general picture of the biochemical mechanism by which activatory isoforms of FcγRs mediate cell activation has emerged [2], the influence of different factors in determining the final cellular response has not been studied in detail. Thus, the influence of factors such as minimum number and/or multiplicity of receptor aggregates, participation in the aggregate of more than one activatory FcγR isoform, conformational factors of the aggregating ligand, the simultaneous stimulation of the cell by other receptors, and the activation/maturation state of the cell on which the receptors are expressed, are unknown.

Cells of the mononuclear phagocyte system undergo a complex maturation process, which can proceed along dif-

ferent routes governed by external stimuli, giving rise to distinct phenotypes of macrophages. Usually, differentiation of monocytes to macrophages involves an increased capacity in Fc γ R-mediated effector functions. Since differentiation commonly increases Fc γ Rs expression, it is usually assumed that the increased effector capacity is related to the increase in expression of Fc γ Rs. However, another possibility, that differentiation-related increases in effector capacity are due to a more efficient signaling by the Fc γ Rs, has not been experimentally examined.

It is known that *in vivo*, differentiation of monocytes can proceed along different pathways, giving rise to distinct populations of cells [15]. Monocytic cell lines have been shown to undergo some differentiation-related changes *in vitro* by treatment with several inducers, such as INF- γ , PMA, retinoic acid, and the active metabolite of Vitamin D3 (1 α ,25-dihydroxy-Vitamin D3), among others. Monocytic cell lines differentiated by distinct agents will produce cell populations with distinct phenotypes.

The maturation-promoting effect of 1 α ,25-di-hydroxy-Vitamin D3 (calcitriol) on monocytic cell lines has been reported by several authors [19–23]. As expected, U-937 cells treated with 100 nM calcitriol for 72 h, showed many differentiation-related changes, such as an increase in CD14 and CR3 expression, lower proliferation rate, and adherence to the plastic surfaces (Fig. 1). Oberg et al. [20] reported an increase in the percentage of U-937 cells expressing CD14, but they did not show the magnitude of the increment in the cell population. We found a ninefold increase in CD14 expression after 72 h of incubation with 100 nM calcitriol. This establishes this molecule as a good marker of calcitriol-induced differentiation of U-937 cells under our experimental conditions.

Calcitriol also induced a small (0.5-fold) but reproducible increment in both surface Fc γ RI and Fc γ RII proteins, as estimated by flow cytometry. However, because of the high homology in the extracellular portions of different isoforms of Fc γ RII, the anti-Fc γ RII IV.3 antibodies bind to both activatory (Fc γ RIIIa and Fc γ RIIIc) and inhibitory (Fc γ RIIb) isoforms. Thus, it was possible that calcitriol altered the balance of activatory versus inhibitory Fc γ RII, which might remain unnoticed in the results obtained by cytometry, but would have an important effect on the phagocytosis of IgG-opsonized particles. It has been shown that Fc γ RIIb^{-/-} murine macrophages exhibit enhanced phagocytosis of IgG coated particles [24]. Also, coligation of Fc γ RIIb with cell-activating antigen (BCR or TCR) or Fc receptors results in down regulation of cell activation, through the action of SH2 domain-containing phosphatases recruited to phosphorylated ITIMs in the cytoplasmic domain of Fc γ RIIb isoforms [25,26]. Therefore, we determined if calcitriol modifies the relative expression of Fc γ RII activatory/inhibitory isoforms using a semiquantitative RT-PCR. In contrast to THP-1 cells where Fc γ RIIb2 is the main Fc γ RIIb isoform detected [18], Fc γ RIIb1 was more highly expressed in U-937 cells, although Fc γ RIIb2 was also

detected in all four independent experiments. In U-937 cells, calcitriol did not induce significant changes in the levels of mRNA for any of the different Fc γ R isoforms.

We found that although the increase in Fc γ R expression was modest (50%), calcitriol treatment induced a significant increase in Fc γ R-mediated erythrophagocytosis (Fig. 2). Thus, differentiation of U-937 cells by VD3 is a suitable model for studying the mechanisms, apart from the increase in the expression of Fc γ Rs, responsible for the increased effector function of macrophages.

We have shown that after differentiation, crosslinking of Fc γ RI and Fc γ RII induced a higher level of tyrosine phosphorylation of Syk. This increase in phosphorylation of Syk is not linked to a higher level of expression of Syk.

It is well established that Syk activation is a crucial step in Fc γ R mediated signaling, and in signaling through other immunoreceptors, like BCR and Fc ϵ RI. Besides its important role in signaling, Syk plays a role in the development of B cells and T cells [9,27,28], but a role for Syk in differentiation of myeloid cells has not been defined.

In previous *in vitro* differentiation studies using HL-60 promonocytic cells, up-regulation of Syk upon differentiation to granulocytes has been reported [29]. We observed that in U-937 cells differentiated with calcitriol, Syk expression is not modified. These results contrast with the findings reported in THP-1 cells, a different monocytic human cell line [18], where Syk expression was found to be increased under the same conditions of calcitriol treatment. The molecular basis for the different effects of calcitriol on different cell lines is unknown. It can be related to the distinct maturation stage of both cell lines, underscoring the relevance of the maturation state of the cell on its response to both inducers of differentiation as well as its response to stimulation through Fc γ Rs. Differential expression and activity of key kinases can be important for differential regulation of cell signaling in cells in distinct maturation stages [30].

Syk phosphorylation and activation needs previous phosphorylation of ITAM sequences in the cytoplasmic portion of the receptors, which in most cases is catalyzed by a Src family kinase. In monocytic cells, Fc γ R crosslinking has been shown to promote phosphorylation and activation of the Src family kinase Lyn and its association to crosslinked Fc γ receptors [6,30,31], suggesting that Lyn is the kinase responsible for phosphorylation of the ITAMs. The essential role of Lyn was shown in reconstitution experiments where Lyn restores the phagocytic capacity of Lyn^{-/-} cells [32]. We found that calcitriol induces a 2.5-fold increase in cellular levels of Lyn. We also observed an increase in phosphorylation of Lyn after Fc γ R crosslinking. This increase is not only a result of a higher amount of Lyn in the cells, but the data show that after differentiation, a higher percentage of the cellular Lyn is phosphorylated after Fc γ R crosslinking. Since the relative levels of expression of the different Fc γ R isoforms do not change upon differentiation, this indicates that in calcitriol-treated U-937 cells, Fc γ R aggregates are more efficient, per unit aggregate, for inducing Lyn phosphorylation.

The mechanisms responsible for the increased capacity of Fc γ R aggregates to induce Lyn activation are currently unknown. Differentiation may be modulating the expression of an as yet unidentified membrane protein whose function can “help” the Fc γ Rs to induce cell activation. Another possibility is that differentiation facilitates or prolongs Fc γ R association with lipid rafts, sites where signaling has been proposed to proceed [33–35]. Yet another possible mechanism is that enhanced tyrosine phosphorylation of Lyn and Syk in calcitriol-differentiated cells results from decreased expression or poor activation of protein phosphatases involved in the negative regulation of signaling. It has been shown that the protein tyrosine phosphatase SHP-1 negatively modulates Syk phosphorylation induced through Fc γ R [36,37]. Regardless of the mechanisms involved, our results indicate that the signaling capacity of Fc γ R aggregates strongly depends on the differentiation state of the cell. Thus, in vivo, the differentiation state of the cell, along with other parameters as the relative expression of Fc γ Rs isoforms, cell type, co-engagement of other receptors, etc., are expected to determine the biochemical and cellular response induced by binding of IgG complexes or IgG-opsonized particles in leukocytes.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Universidad Nacional Autónoma de México (IN 213701 and 237204) and Conacyt (45092). We thank Dr. Armida Báez for her help with the FACscan cytometer.

References

- [1] Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2001;19:275–90.
- [2] Isakov N. ITIMs and ITAMs. The Yin and Yang of antigen and Fc receptor-linked signaling machinery. *Immunol Res* 1997;16:85–100.
- [3] Daron M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* 1997;15:203–34.
- [4] Pan L, Pei P. Signaling transduction by IgG receptors. *Chin Med J* 2003;116:487–94.
- [5] Post CB, Gaul BS, Eisenmesser EZ, Schneider ML. NMR structure of phospho-tyrosine signaling complexes. *Med Res Rev* 1999;19:295–305.
- [6] Wang AV, Scholl PR, Geha RS. Physical and functional association of the high affinity immunoglobulin G receptor (Fc γ RI) with the kinases Hck and Lyn. *J Exp Med* 1994;180:1165–70.
- [7] Chacko G, Duchemin AM, Coggeshall KM, Osborne JM, Brant JT, Anderson CL. Clustering of the platelet Fc receptor induces noncovalent association with the tyrosine kinase p72 Syk. *J Biol Chem* 1994;269:32435–40.
- [8] Ghazizadeh S, Bolen JB, Fleit HB. Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc γ RII in monocytic THP-1 cells. *J Biol Chem* 1994;269:8878–84.
- [9] Turner M, Schweighoffer E, Colucci F, Di Santo JP, Tybulewicz VL. Tyrosine kinase Syk: essential functions for immunoreceptor signaling. *Immunol Today* 2000;21:148–54.
- [10] van Oers NS, Weiss A. The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signaling processes. *Semin Immunol* 1995;7:227–36.
- [11] Majeed M, Cavegion E, Lowell CA, Berton G. Role of Src kinases and Syk in Fc γ receptor-mediated phagocytosis and phagosome-lysosome fusion. *J Leukoc Biol* 2001;70:801–11.
- [12] Raeder EM, Mansfield PJ, Hinkoyska-Galcheva V, Shayman JA, Boxer LA. Syk activation initiates downstream signaling events during human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis. *J Immunol* 1999;163:6785–93.
- [13] Matsuda M, Park JG, Wang DC, Hunter S, Chen P, Schreiber AD. Abrogation of the Fc γ receptor IIA mediated phagocytosis signal by stem-loop Syk antisense oligonucleotides. *Mol Biol Cell* 1996;7:1095–106.
- [14] Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, et al. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc γ receptors on macrophages. *J Exp Med* 1997;186:1027–39.
- [15] Auger MJ, Ross JA. The biology of the macrophage. In: Lewis CE, McGee JD, editors. *The macrophage*. New York: Oxford University Press; 1992. p. 3–74.
- [16] Rigby WF, Ball E, Guyre P, Fanger W. Differentiation of a human monocytic cell line by 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol): a morphologic, phenotypic, and functional analysis. *Blood* 1984;64:1110–5.
- [17] Jungi TJ. A rapid and sensitive method allowing photometric determination of erythrophagocytosis by mononuclear phagocytes. *J Immunol Methods* 1985;82:141–8.
- [18] Agramonte-Hevia J, Hallal C, Garay C, Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I, Ortega E. 1 α ,25-Dihydroxy Vitamin D3 alters Syk activation through Fc γ RII in monocytic THP-1 cells. *J Cell Biochem* 2003;89:1056–76.
- [19] Botling J, Oberg F, Torma H, Tuohimaa P, Blauer M, Nilsson K. Vitamin D3- and retinoic acid-induced monocytic differentiation: interactions between the endogenous Vitamin D3 receptor, retinoic acid receptors, and retinoid X receptors in U-937 cells. *Cell Growth Differ* 1996;7:1239–49.
- [20] Oberg F, Hult N, Bjare U, Ivhed I, Kivi S, Bergh J, et al. Characterization of a U-937 subline which can be induced to differentiate in serum-free medium. *Int J Cancer* 1992;50:153–60.
- [21] Oberg F, Botling J, Nilsson K. Functional antagonism between Vitamin D3 and retinoic acid in the regulation of CD14 and CD23 expression during monocytic differentiation of U-937 cells. *J Immunol* 1993;150:3487–95.
- [22] Testa U, Masciulli R, Tritarelli E, Pustorino R, Mariani G, Martucci R, et al. Transforming growth factor-beta potentiates Vitamin D3-induced terminal monocytic differentiation of human leukemic cell lines. *J Immunol* 1993;150:2418–30.
- [23] Kolset SO, Iyhed I, Overvant A, Nilsson K. Differentiation-associated changes in the expression of chondroitin sulfate proteoglycan in induced U-937 cells. *Cancer Res* 1988;48:6103–8.
- [24] Clynes R, Maizes JS, Guinamard R, Ono M, Takai T, Ravetch JV. Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *J Exp Med* 1999;189:179–85.
- [25] Sarkar S, Schlottmann K, Cooney D, Coggeshall KM. Negative signaling via Fc γ RIIB1 in B cells blocks phospholipase C gamma2 tyrosine phosphorylation but not Syk or Lyn activation. *J Biol Chem* 1996;271:20182–6.
- [26] DeFranco AL, Richards JD, Blum JH, Stevens TL, Law DA, Chan VW, et al. Signal transduction by the B-cell antigen receptor. *Ann N Y Acad Sci* 1995;766:195–201.
- [27] Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB, Pawson T. Syk tyrosine kinase is required for mouse viability and B cell development. *Nature* 1995;378:303–6.
- [28] Mallick-Wood CA, Pao W, Cheng AM, Lewis JM, Kulkarni S, Bolen JB, et al. Disruption of epithelial gamma-delta T cell repertoires by mutation of Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9704–9.

- [29] Qin S, Yamamura H. Up-regulation of Syk activity during HL-60 cell differentiation into granulocyte but not into monocyte/macrophage-lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:697–701.
- [30] Katagiri K, Katagiri T, Koyama Y, Morikawa M, Yamamoto T, Yoshida T. Expression of Src family genes during monocytic differentiation of HL-60 cells. *J Immunol* 1991;146:701–7.
- [31] Durden DL, Liu Y. Protein-tyrosine kinase p72^{Syk} in FcγRI receptor signaling. *Blood* 1994;84:2102–8.
- [32] Suzuki T, Kono H, Hirose N, Okada N, Yamamoto K, Honda Z. Differential involvement of Src family kinases in Fcγ receptor mediated phagocytosis. *J Immunol* 2000;165:473.
- [33] Pizzo P, Giurisato E, Bigsten A, Tassi M, Tavano R, Shaw A, et al. Physiological T cell activation starts and propagates in lipid rafts. *Immunol Lett* 2004;91:3–9.
- [34] Sharma P, Varma R, Sarasij RC, Ira, Gousset K, Krishnamoorthy G, et al. Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell* 2004;116:577–89.
- [35] Gomez-Mouton C, Lacalle RA, Mira E, Jimenez-Baranda S, Barber DF, Carrera AC, et al. Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis. *J Cell Biol* 2004;164:759–68.
- [36] Huang ZY, Hunter S, Kim MK, Indik ZK, Schreiber AD. The effect of phosphatases SHP-1 and SHIP-1 on signaling by the ITIM- and ITAM-containing Fcγ receptors FcγRIIB and FcγRIIA. *J Leukoc Biol* 2003;73:823–9.
- [37] Ganesan LP, Ang H, Marsh CB, Susheela T. The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the phosphorylated Immunoreceptor Tyrosine-based-Activation Motif of FcγRIIA to modulate signaling events in myeloid cells. *J Biol Chem* 2003;278:35710–7.