



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

**ANALISIS DE PROTEINAS QUE SE UNEN AL ITAM DE  
RECEPTORES Fc $\gamma$ RI O Fc $\gamma$ RII EN CELULAS THP-1 INDUCIDAS A LA  
DIFERENCIACION CON VITAMINA D3.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

**ALEJANDRO GARCIA ROMERO**

D I R E C T O R D E T E S I S:

**DRA. ISABEL SOTO CRUZ**

A S E S O R:

**DR. ARTURO VALLE MENDIOLA**





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.

**El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Oncología Molecular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la FES Zaragoza, con apoyo financiero del Programa PAPIIT de la DGAPA, UNAM. (Proyecto IN 222008).**

Quiero agradecer a Dios por darme más de lo que merezco.

Agradezco a mi mamá Martha Romero Ortiz, por enseñarme en cada momento con su ejemplo, el sacrificio y la buena voluntad para luchar por lo que uno anhela.

A mis hijos Liliana Angélica, Ana Lilia y Abraham quienes me han acompañado y motivado en todo momento.

A Arturo Valle por ser un buen amigo.

A todos mi compañeros de la facultad por ser mis amigos.

CONTENIDO	
_Resumen.....	4
_Introducción.....	5
_Fagocitos mononucleares.....	5
_Receptores en monocitos-macrófagos.....	7
_Receptores que participan en el reconocimiento del antígeno .....	9
_Estructura y expresión de FcR que presentan ITAM .....	10
_Agregación de FcR: el inicio de la señal extracelular .....	12
_Estructura de Syk .....	14
_Vitamina D .....	17
. Bioactivación de la vitamina D3 .....	17
. Transporte de la vitamina D .....	19
. Acciones de 1, 25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> -VDR .....	19
. Acción de la 1,α-hidroxilasa .....	21
. Acciones biológicas de la vitamina D.....	23
_Justificación.....	26
_Hipótesis.....	27
_Objetivos.....	27
_Materiales y métodos.....	28
_Resultados.....	31
_Discusión.....	38
_Conclusiones.....	43
_Perspectivas.....	44
_Bibliografía.....	45
_Anexo: Reactivos y soluciones.....	52

## RESUMEN

Monocitos y macrófagos expresan receptores para la porción de inmunoglobulina G (Fc $\gamma$ R) que participan en la fagocitosis de patógenos. Los Fc $\gamma$ R no tienen actividad intrínseca de cinasa, pero al ser agregados inician una cascada de señales que involucran la actividad de cinasas de la familia Src, Syk-Zap70, PKC, PI3K y ERK, así como de fosfatasa de la familia SHP.

Los Fc $\gamma$ R están constituidos por subunidades que unen al ligando y subunidades asociadas. Las cadenas involucradas en reconocer al ligando tienen en su región extracelular dominios de inmunoglobulinas. Las subunidades asociadas tienen en su región citoplásmica estructuras secundarias involucradas en la activación de respuestas celulares, que están compuestas por pares de tirosinas y leucinas o isoleucinas dentro de la secuencia consenso YxxL(x)<sub>7-12</sub>YxxL/I (donde x representa residuos no conservados). Esta secuencia es designada ITAM, y en ella existe una constante de fosforilación y desfosforilación en sus residuos de tirosina en respuesta a diversos estímulos tanto externos como internos.

Este trabajo se enfocó en determinar cómo el estado de maduración de células monocíticas THP-1 influye en la activación de la vías bioquímicas involucradas en la activación celular a través del receptor Fc $\gamma$ RI. Se analizó la unión de diversas proteínas al módulo ITAM fosforilado, en células inducidas a la diferenciación mediante el tratamiento con VD3 y después del entrecruzamiento del Fc $\gamma$ RI. Los resultados muestran la unión de varias proteínas con diferente peso molecular al motivo ITAM. Una de esas proteínas se identificó como Syk y también se determinó la unión de SHP-1 al ITAM. Tanto Syk como SHP-1 son moléculas importantes en la transducción de señales activadas a través de FcR.

## INTRODUCCIÓN

Las respuestas del sistema inmune pueden clasificarse en innatas y adquiridas. En las respuestas innatas participan receptores moleculares y celulares capaces de reconocer determinantes comunes a muchos patógenos sin necesidad de una sensibilidad previa. En las respuestas adquiridas participan linfocitos T y B con receptores específicos para un antígeno particular que han sido seleccionados por su capacidad de reconocerlo. Ambas respuestas dependen de las actividades de los glóbulos blancos o leucocitos. Cada tipo de respuesta utiliza distintos mecanismos de reconocimiento y también mecanismos efectores característicos, que serán además los que producirán el efecto colateral del daño tisular.<sup>1,2</sup>

Las células que participan en las respuestas inmunitarias adaptativas son linfocitos específicos de antígenos, células accesorias especializadas que participan en la activación linfocitaria y células efectoras cuya función consiste en eliminar a los antígenos<sup>3</sup>.

Las células accesorias (clásicamente se han denominado así a aquellas que cooperan con los anticuerpos en sus acciones microbidas o proinflamatorias) tienen receptores para las regiones constantes de los anticuerpos (FcR) que reconocen a los patógenos recubiertos de anticuerpos y participan en la iniciación de las respuestas de los linfocitos frente a los antígenos<sup>3</sup>. La unión cruzada de los receptores Fc ocupados por inmunoglobulinas que reconocen el antígeno provoca la activación de estas células que atacan al patógeno reconocido por las moléculas de anticuerpos.<sup>3,4,5</sup>

## FAGOCITOS MONONUCLEARES

Actualmente, el conjunto formado por los precursores medulares, los monocitos y los macrófagos tisulares, se engloban bajo la denominación de Sistema Fagocítico Mononuclear (SMF). Estas células cumplen papeles importantes en los mecanismos de defensa innatos y en los mecanismos de la inmunidad adaptativa.

Dentro de las funciones de estas células están el reconocimiento y eliminación de microorganismos invasores y células tumorales, la regulación de la proliferación de numerosos tipos celulares tanto del sistema inmunológico como de otros sistemas y la secreción de un amplio grupo de sustancias participantes en el proceso inflamatorio<sup>6</sup>

Las células del sistema fagocítico mononuclear se originan en la médula ósea, derivan de un progenitor granulo-monocítico y bajo la influencia del factor estimulador de colonias 1 (CSF-1) se originan los monocitos, circulan en la sangre, maduran y se activan en diversos tejidos. A nivel genético varios factores de transcripción son activados, como el factor PU.1, producto del protooncogen Spi-1, miembro de la familia de protooncogenes que es esencial para el desarrollo del macrófago. Otros factores de transcripción como GATA-1 y GATA-2 controlan la sobrevivencia y/o diferenciación de precursores mieloides. El primer tipo de célula que entra en la sangre periférica tras abandonar la médula ósea no está completamente diferenciada y recibe el nombre de monocito. Los monocitos tienen un diámetro de 10 a 15  $\mu\text{m}$ , y poseen un núcleo en forma de riñón o herradura y un citoplasma finamente granular que contiene lisosomas, vacuolas fagocíticas y filamentos citoesqueléticos. Una vez que colonizan los tejidos, estas células maduran y se convierten en macrófagos. Los macrófagos pueden adoptar diversas formas. Algunos adquieren un citoplasma abundante y se llaman células epiteloides debido a su semejanza con las células epiteliales de la piel. Los macrófagos son capaces de fusionarse para formar células gigantes multinucleadas. Estos se encuentran en todos los órganos y tejidos conectivos y reciben nombres especiales para designar localizaciones específicas. Por ejemplo, en el sistema nervioso central son las “células microglia”; los que revisten los capilares sinusoidales del hígado se llaman “células de Kupffer”; en las vías aéreas pulmonares son los “macrófagos alveolares”; y los fagocitos multinucleados del hueso se denominan “osteoclastos”.



## RECEPTORES EN MONOCITOS-MACRÓFAGOS

Muchas de las proteínas con actividad de receptor interactúan físicamente con proteínas del citoesqueleto permitiendo que estímulos externos repercutan en las funciones motrices de las células. Las proteínas de membrana funcionan como transportadores, receptores o ligandos que median la interacción con el microambiente y con otras células.

La mayoría de los monocitos son CD14<sup>+/+</sup>/CD16<sup>-/-</sup>, los más diferenciados son CD14<sup>+/+</sup>/CD16<sup>+/+</sup>. Otros marcadores expresados en distintos tipos de macrófagos son HLA-DR, CD11b (CR3) Y CD11c (CR4) (ambos marcadores miembros de la familia de integrinas), CD25, CD69, CD36, CD26 y HLA-DP y -DQ<sup>6</sup>(Tabla 1).

Tabla 1. Principales receptores de macrófagos, sus ligandos y funciones (Modificado de 9).

RECEPTOR	LIGANDOS	FUNCIÓN
CD14	LPS, muraldipeptido, peptido glicano soluble, proteína WI-1 de la superficie de hongos, células apoptóticas.	Reconocimiento y fagocitosis de patógenos y células apoptóticas.
CD36	Colágeno tipo I, fosfatidilserina, trombospondina.	Deposito de colesterol en lipoproteínas, limpieza de células apoptóticas.
<b>RECEPTORES DEL COMPLEMENTO</b>		
CR1	C3b, C4b, C3bi	Internalización de microorganismos.
CR3 CD11b/CD18	C3bi, CD54 (ICAM-1); fibrinógeno, oligodesoxinucleótidos.	Interacción de macrófago-LF T (CR3), inhibición de la producción de IL-12 (CR3)
CR4	C3bi	No se conoce
Receptores Fc	IgG, partículas cubiertas de IgG	Internalización de macrófagos opsonizados. Inhibición (Fc $\gamma$ R1IB) o activación (Fc $\gamma$ R1, Fc $\gamma$ R1IA y Fc $\gamma$ R1IIA) del macrófago.
Receptor de manosa	Oligosacáridos que contienen manosa y fucosa	Reconocimiento y fagocitosis de patógenos.
NKG2D	Productos del gen RAE-1 y H60, MIC A y MIC B.	Activación de macrófagos para la producción de TNF y NO.
Proteína reguladora de señal $\alpha$ (SIRP $\alpha$ )	CD47 (proteína asociada a integrinas)	Agregación homotípica y activación de macrófagos, interacción de macrófagos con linfocitos T.
<b>RECEPTORES TOLL</b>		
TLR2	Oligosacáridos que contienen manosa, fucosa o galactosa.	Unión a productos microbianos, activación de macrófagos.
TLR4,5,6 y 9	LPS, flagelina, lipopéptido de micoplasma y oligonucleótido bacterianos respectivamente.	Unión a productos microbianos, activación de macrófagos.
Receptor de Vitronectina ( $\alpha_v\beta_3$ )	Vitronectina, laminina, fibronectina.	Estimulación de la polimerización de actina.

## RECEPTORES QUE PARTICIPAN EN EL RECONOCIMIENTO DEL ANTÍGENO

Los receptores para las moléculas de inmunoglobulinas juegan un papel importante en el sistema inmunológico, pues sirven como puente de enlace entre el reconocimiento del antígeno por parte de los anticuerpos específicos, y la activación de células que llevan a cabo una amplia gama de funciones efectoras. En casi todas las células hematopoyéticas (exceptuando el linaje eritroide), se expresan receptores para inmunoglobulina G. La agregación de estos receptores por grupos de IgG (en la forma de complejos antígeno-anticuerpo, células o bacterias opsonizadas, etc) induce una amplia gama de respuestas efectoras tales como proliferación y/o diferenciación, citotoxicidad contra células blanco, secreción de citocinas o de mediadores inflamatorios, endocitosis y fagocitosis, entre otras. Las funciones efectoras mediadas por la agregación de los receptores Fc $\gamma$ R dependen, por un lado, del tipo de célula de que se trate, y por otro lado, pueden ser moduladas por la acción de diversas citocinas sobre la célula. El ejemplo más conocido de ello es el incremento en la actividad fagocítica y citotóxica inducida en células del linaje monocito-macrófago por el interferón gamma y otros compuestos activadores como lipopolisacáridos bacterianos, etc. <sup>5,6</sup>

Los receptores para la porción Fc de la inmunoglobulina G (Fc $\gamma$ R), el receptor para la porción Fc de la inmunoglobulina E (Fc $\epsilon$ R) y los receptores de membrana involucrados en el reconocimiento del antígeno que incluyen a los receptores de antígeno de las células B (BCR) y los receptores de antígeno de las células T (TCR), se agrupan debido a que las características estructurales y mecanismos bioquímicos de activación celular son similares para todas estas moléculas. Este conjunto de receptores se denominó como receptores multicadena de reconocimiento inmune (MIRR, por sus siglas en inglés)<sup>8</sup>.

Actualmente se conocen tres tipos de receptores para IgG, denominados Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII y dentro de cada tipo existen a su vez distintas isoformas. Las regiones extracelulares a través de las cuales los receptores unen a las moléculas de IgG son homólogas, y más aún, no muestran selectividad clara por los distintos

isotipos de IgG, es decir la afinidad relativa de unión de los distintos isotipos de IgG a los receptores de los tipos I, II, y III muestran la misma secuencia  $IgG3 = IgG1 \gg IgG2, IgG4$ .<sup>5</sup>

El estudio de los mecanismos bioquímicos involucrados en la activación de células a través de estos receptores es un área de investigación importante, pues podría sugerir mecanismos para modular, con fines terapéuticos, la activación leucocitaria. Se sabe que la simple unión del anticuerpo al sitio de unión de los receptores, no es suficiente para inducir la activación celular. Más bien, es necesaria la agregación de los receptores para iniciar la cascada de activación. Actualmente se considera que el evento bioquímico inicial es la rápida fosforilación de los residuos de tirosina de varias proteínas celulares, incluyendo algunas cadenas de los mismos receptores, así como cinasas de tirosina pertenecientes a las familias de Src y Syk/ZAP70. Estas fosforilaciones son seguidas de movilizaciones de iones  $Ca^{2+}$ , hidrólisis de fosfolípidos de inositol, activación de otras cinasas específicas de tirosina y de serina/treonina, fosforilación de distintos sustratos celulares incluyendo proteínas del citoesqueleto, etc.<sup>5,7</sup>

#### ESTRUCTURA Y EXPRESION DE FcR QUE PRESENTAN ITAM.

Las regiones ITAM están involucradas en los mecanismos de activación celular.

Existen 4 multicadenas de FcR con ITAMs:  $Fc\gamma RI$ ,  $Fc\gamma RIIA$ ,  $Fc\epsilon RI$  y  $Fc\alpha RI$ . Los  $Fc\gamma RI$  son expresados por macrófagos, monocitos y neutrófilos. Los  $Fc\gamma RIIIA$  son expresados por macrófagos, monocitos activados, células NK, células pre-B y células T. Los  $Fc\epsilon RI$  son expresados principalmente por células cebadas y basófilos pero también por células de Langerhans humanas, eosinófilos y monocitos de pacientes alérgicos. Los  $Fc\alpha RI$  son expresados por macrófagos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos. Las subunidades  $\alpha$  del FcR multicadena, carecen de ITAM pero enlazan al ligando, son moléculas transmembrana que tienen 2 o 3 dominios de inmunoglobulinas de tipo variable. Ellos se asocian con una subunidad  $\gamma$  homodimérica común y en células cebadas con una subunidad  $\beta$

de cadena simple que tiene 4 dominios transmembrana y sus extremos amino y carboxi terminales son ambos intracitoplásmicos (figura 1).<sup>1,2,5</sup>

En humanos, los genes que codifican la subunidad  $\alpha$  de Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ R111A y Fc $\epsilon$ RI están agrupados en el brazo largo del cromosoma 1 (1q21.1, 1q23-24 y 1q23, respectivamente), mientras que el gen que codifica la subunidad  $\alpha$  de Fc $\alpha$ RI esta localizado en el cromosoma 19 (19q13.4). Hay un ITAM en el dominio intracitoplásmico de cada cadena  $\gamma$  y uno en el dominio carboxiterminal en la cadena  $\beta$  (figura 1)<sup>5</sup>

Los genes de Fc $\alpha$  son expresados principalmente por células del linaje mieloides (sólo el Fc $\gamma$ R111A también se expresa por subpoblaciones de células linfoides). Los del Fc $\gamma$ RI son expresados por macrófagos, monocitos y neutrófilos. Los del Fc $\gamma$ R111A son expresados por macrófagos, monocitos activados, células NK, células preB y células T, notablemente en la subpoblación  $\gamma/\delta$ . El Fc $\gamma$ R11A y Fc $\gamma$ R11C son los únicos FcR de cadena simple con un ITAM. Son codificados por 2 genes relacionados localizados también en el cromosoma 1 (1q23-24). Los genes de Fc $\gamma$ R11A y Fc $\gamma$ R11C son expresados principalmente por células de linaje mieloides tal como monocitos, macrófagos y neutrófilos, así como también por células megacariocíticas y plaquetas. Los genes del Fc $\gamma$ R11A también son expresados por linfocitos B.

Todos los receptores Fc $\gamma$  muestran un alto grado de identidad en la secuencia de sus porciones extracelulares (50-96%), pero significativamente diferentes en sus dominios citoplásmicos. Algunos receptores Fc $\gamma$  contienen el motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM) o el motivo inhibidor correspondiente (ITIM) en sus tallos citoplásmicos, tal como el Fc $\gamma$ R11b. Otros (Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ R111A) requieren la asociación de la cadena  $\gamma$  común de FcR que contienen ITAM o la cadena  $\zeta$  del receptor de la célula T.<sup>10</sup>

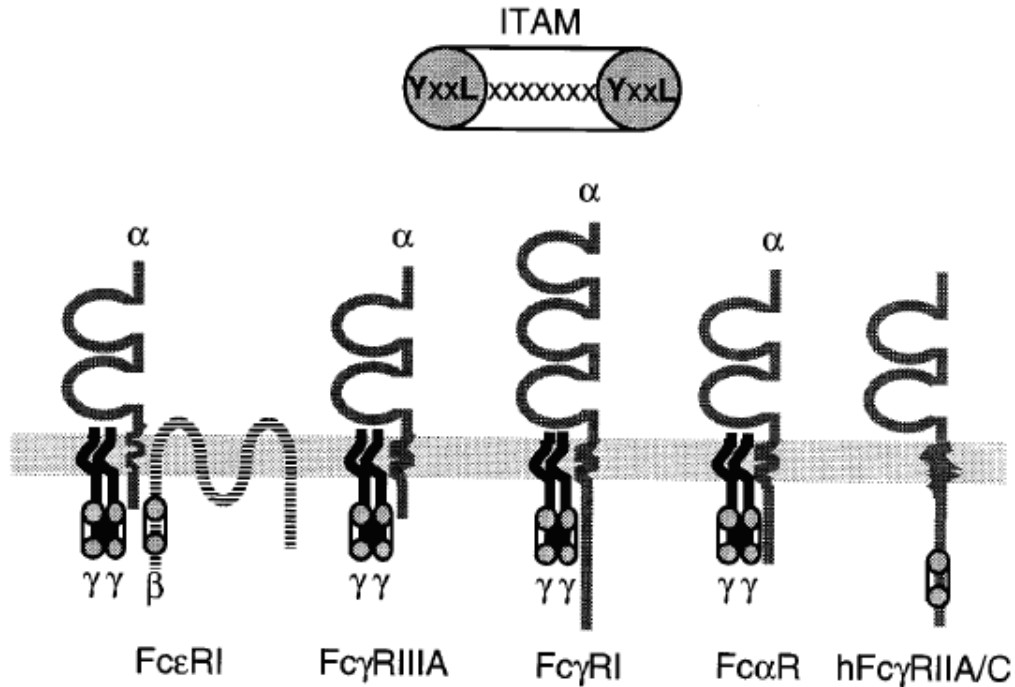


Fig. 1.- Estructura esquemática de FcR con ITAM. La banda gris representa la membrana que separa los dominios extracelulares (arriba) de los dominios intracitoplásmicos (abajo) (Modificado de 5)

#### AGREGACIÓN DE FcR: EL INICIO DE LA SEÑAL EXTRACELULAR

Los receptores de membrana para la porción Fc de inmunoglobulinas son expresados en muchos tipos de células hematopoyéticas<sup>7</sup>. Para transmitir señal a la célula, los FcR necesitan ser agregados en la superficie celular por anticuerpos y antígenos multivalentes. Los MIRR no tienen actividad de cinasa intrínseca<sup>9</sup>. Para que estos receptores induzcan respuestas es necesario que sean agregados y con ello induzcan la activación de cinasas de tirosinas intracelulares, las cuales fosforilan los residuos de tirosina del ITAM.<sup>8,11</sup>.

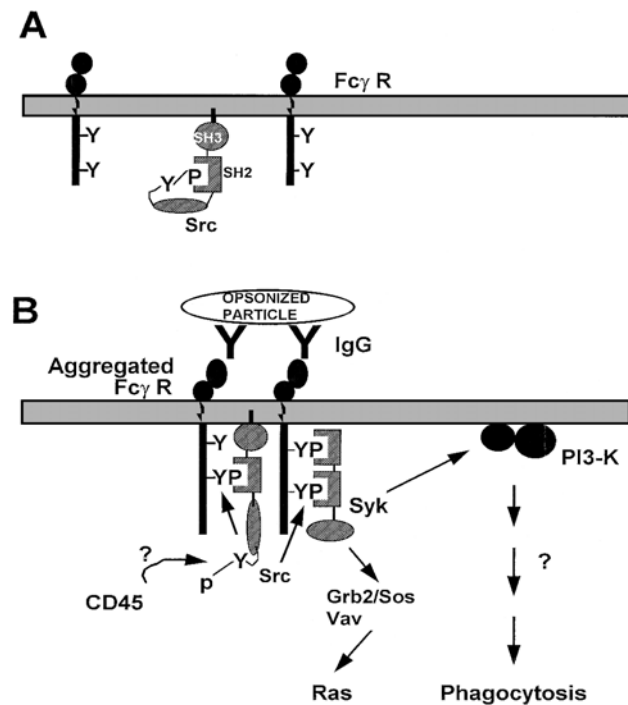
La interacción entre el FcR e IgG dispara una rápida fosforilación de residuos de tirosina específicos en el receptor dentro de los motivos ITAMs. El FcγRIIA contiene un ITAM dentro de su dominio citoplásmico, mientras que los ITAMs pertenecientes para FcγRI y FcγRIIIA son contenidos dentro de una molécula separada, la subunidad dimérica  $\gamma$ , que está asociada con el receptor.

La fosforilación inicial del ITAM es llevada por tirosinas cinasas de la familia Src. Estas son mantenidas normalmente en un estado inactivo por una interacción

entre un residuo de tirosina fosforilada dentro de su tallo y su dominio SH2 (fig. 2). Se propone que la activación se da por desfosforilación, que en leucocitos puede ser llevada a cabo por la fosfatasa de superficie celular CD45.<sup>12,13</sup>

Después de su fosforilación, los motivos ITAM actúan como sitio de enlace para Syk que también es fosforilada y activada.<sup>14</sup>

La agregación de los Fc $\gamma$ R también induce la activación de la cinasa de Bruton (Btk) y Emt, la cinasa de adhesión focal (FAK), la proteína cinasa C (PKC), la proteína cinasa A (PKA) y la vía de señalización de la cinasa activada por mitógenos, ERK. También participan la fosfatidil-inositol 3 cinasa (PI3-K) y la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), la fosfolipasa C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1) y la fosfolipasa C $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2) así como también la fosfolipasa D (PLD). Las relaciones causales, temporales y de modulación recíproca entre estas enzimas, así como su relación con las vías específicas de señalización de los distintos FcR, varían dependiendo del receptor que es activado, del tipo de célula que es estimulado, así como del estado de maduración y activación celular.<sup>7,8</sup>



**Fig. 2** Activación de las vías de señalización del receptor Fc $\gamma$ R por entrecruzamiento del anticuerpo. (Modificado de 7)

## ESTRUCTURA DE SYK

La familia Syk/Zap-70 de cinasa de tirosina citoplásmicas comprenden 2 miembros llamados Syk y Zap-70. Mientras que Syk esta presente en la mayoría de las células hematopoyéticas, incluyendo células B y células cebadas, Zap-70 esta restringido a células T y células NK. Syk también esta expresada en células T selectas, incluyendo en la mayoría de poblaciones de timocitos y linfocitos intraepiteliales  $T\gamma\delta$ . Syk es expresada en líneas celulares de origen epitelial, pero su función en estas células aún no se conoce. Se ha documentado que Syk es comúnmente expresado en tejido normal de seno humano, en lesiones benignas de seno y en líneas celulares de cáncer de seno de baja tumorigenicidad<sup>5</sup>. Los niveles de expresión baja de Syk se encuentra en células maduras  $T\alpha\beta$ . La estructura de Syk y Zap-70 esta altamente conservado. Esto incluye, desde el N-terminal hasta C-terminal (fig. 3): i) 2 dominios SH2, que enlazan el doble ITAM fosforilado; ii) una región "linker", que contiene sitios de fosforilación de tirosina que media el reclutamiento de efectores río abajo tal como fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) y Vav; iii) un dominio catalítico, incluyendo sitios de enlace para ATP y fosforilación de tirosina; y iv) una extensión corta C-terminal de funciones hasta ahora desconocidas<sup>15,16</sup>.

Utilizando mapeo con fosfopéptidos se han identificado 10 residuos de tirosina en Syk que pueden autofosforilarse. La fosforilación de estos residuos de tirosina proveen sitios de enlace para los dominios SH2 de otras moléculas, regula la actividad enzimática e interactúa con otras moléculas<sup>17</sup>.

El sistema de dominios SH2 tanto de Zap-70 como de Syk son importantes para su asociación con receptores de antígenos fosforilados. Los dominios SH2 de N-terminal de Syk/Zap-70 enlazan a pYXXL C-terminal del ITAM, mientras que los dominios SH2 C-terminal enlaza a pYXXL N-terminal. La estructura cristal de la serie de dominios SH2 de Syk sugiere que estos dominios pueden funcionar como unidades independientes. Además, la orientación relativa de los dominios SH2 de Syk despliega una flexibilidad conformacional extraordinaria. Sin embargo, hay varias diferencias entre Syk y Zap-70. Primero, la capacidad de Syk para sufrir



autofosforilación y para fosforilar a Cdb3 es mucho mayor que el de Zap-70. Segundo, el ITAM fosforilado induce la activación de Syk, mientras que Zap-70 requiere además de la entrada estimuladora de Lck. Tercero, hay 10 veces más co-precipitación con Syk que con Zap-70 con el péptido fosforilado de FcεRIγ-ITAM (fig 4)<sup>17</sup>.

SykB es una isoforma natural de Syk que fue identificada en células de ratones, ratas y humanos. Como una consecuencia de empalme alternativo de un exón de 69 aminoácidos en el gen de *syk* que carece de un inserto de 23 aminoácidos en la región linker. Es de resaltar que esta isoforma está altamente conservada en ratones, ratas, humanos y cerdos. Sin embargo, no está presente en Zap-70, aunque el resto del dominio linker de Zap-70 es significativamente homólogo al de Syk<sup>15</sup>.

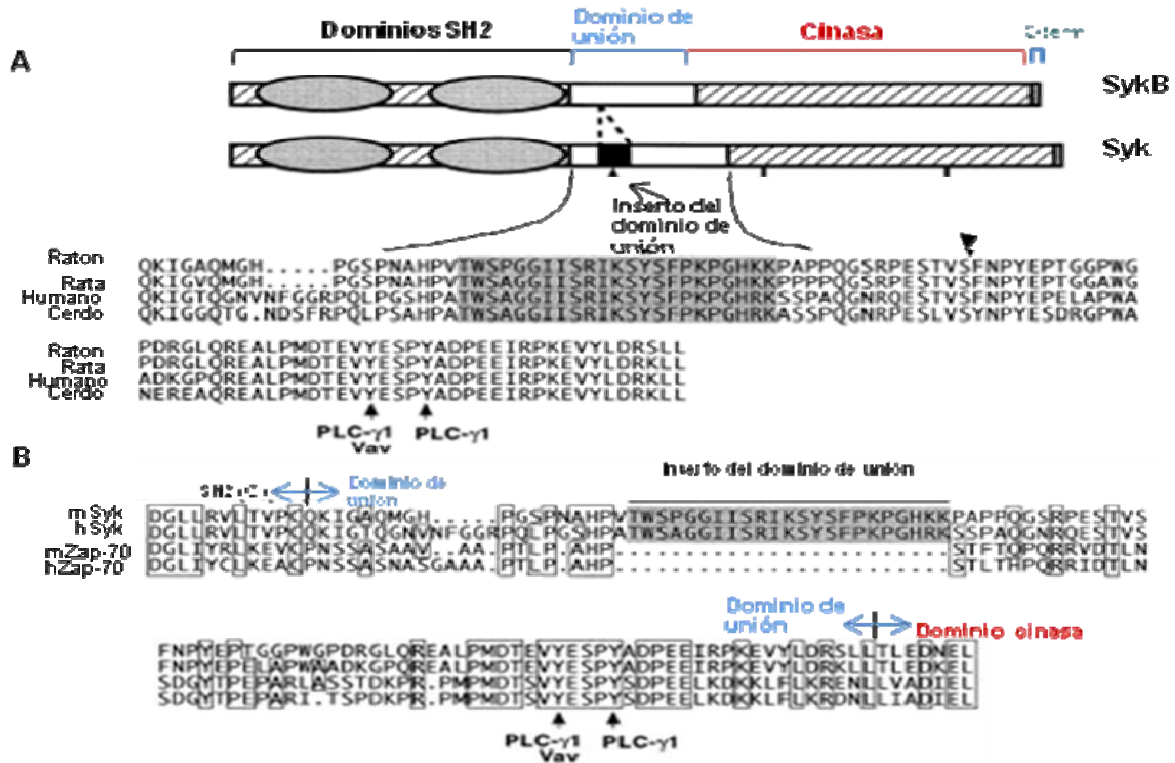


fig. 3 Estructura y secuencia de Syk, Syk B y ZAP-70. A) Estructura de Syk y Syk B, así como la ubicación el inserto linker de 23 aminoácidos de Syk, son remarcados en la superficie. Son indicados las posiciones de los sitios de enlace a ATP, lisina 396 (K 396) y los sitios de fosforilación de tirosina en el dominio cinasa (tirosinas 519 y 520; Y519/Y520). La secuencia del dominio linker de Syk en diversas especies es mostrado hasta el fondo. Los puntos indican los aminoácidos perdidos. El inserto linker conservado es sombreado y la posición de la tirosina 290 es resaltado por un asterisco. El sitio putativo de la hendidura proteolítica es mostrado con una doble flecha, mientras que sus ligandos a PLC  $\gamma$ -1 y Vav son indicados con flechas simples. (B) Dominio Linker de Syk y Zap-70. Las secuencias del dominio linker de Syk de ratón (mSyk), Syk de humano (hSyk), Zap-70 de ratón (mZap-70) y Zap-70 de humano (hZap-70) son comparados. Las áreas de identidad son embaladas y el inserto linker es sombreado. Los sitios de enlace putativos para PLC  $\gamma$ -1 y Vav son indicados con flechas simples. (Modificado de 15)

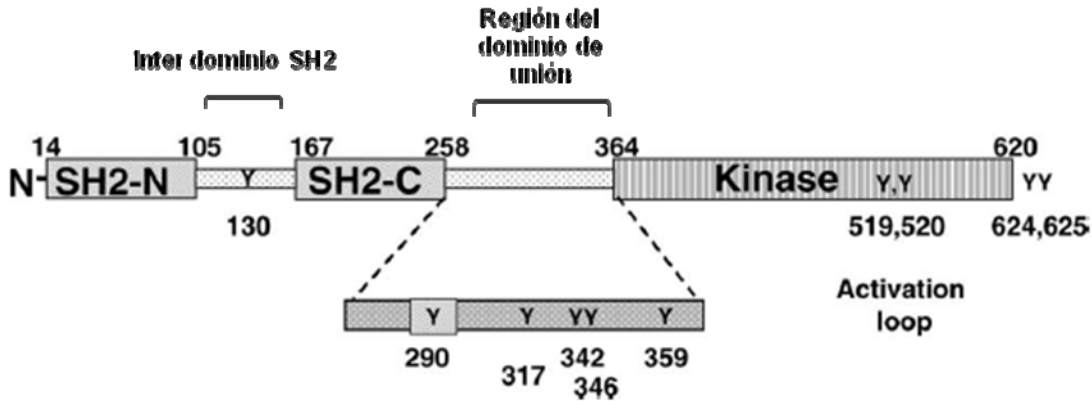


fig. 4 Diagrama esquemática de Syk. Los números refieren a la secuencia de aminoácidos en rata de los diferentes dominios. Son indicados algunas de las principales tirosinas (Y) que son fosforiladas. La región linker se muestra en una vista aumentada con la región alternativamente empalmada alrededor de Y290. (Modificado de 15)

## VITAMINA D

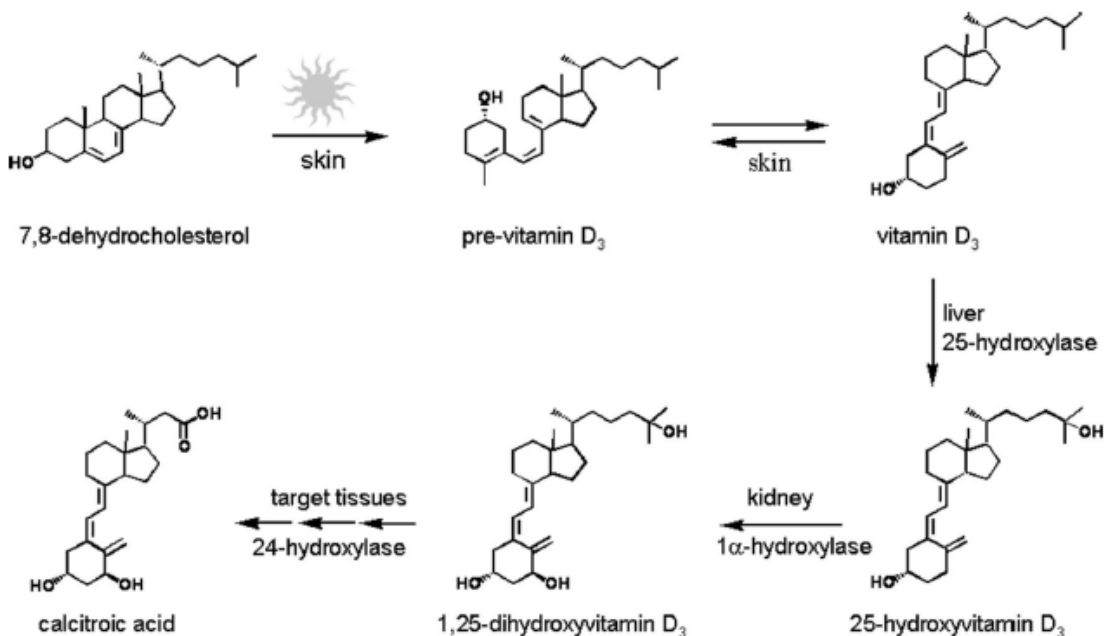
La vitamina D, es un nutriente esencial para la prevención de raquitismo, se requiere para la absorción óptima de calcio y fósforo de la dieta. En estudios subsecuentes se encontró que el raquitismo puede ser prevenido por irradiación con luz UV, que estimula la formación de vitamina D3 por la piel. Esta habilidad para producir suficiente cantidad de vitamina D3 con adecuada exposición de luz solar indica que la vitamina D3 realmente no es una vitamina. Se aprecia ahora que la vitamina D3 es metabolizada a la hormona esteroide 1,25-dihidroxitamina D3 [1,25(OH)2D3] o calcitriol. Las primeras observaciones de que los metabolitos de la vitamina D3 interactúan con una proteína en extractos de intestino llevaron a la identificación del receptor de la vitamina D, un miembro de la superfamilia de receptor esteroide.<sup>18</sup>

### Bioactivación de la vitamina D

La vitamina D puede ser obtenida de la dieta o por la acción de la luz solar en la piel. La exposición de la piel a los rayos UV de la luz solar induce la conversión fotolítica de 7-dihidrocolesterol a previtamina D<sub>3</sub> seguido por la isomerización termal a vitamina D3.<sup>19,20</sup>

El primer paso en la activación metabólica de la vitamina D es la hidroxilación del carbono 25, que ocurre principalmente en el hígado (fig. 5).

El segundo paso en la bioactivación de la vitamina D, es la formación de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D ( $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ ) a partir de la 25-hidroxitamina D, que ocurre bajo condiciones fisiológicas, principalmente en el riñón<sup>21</sup> (fig. 6). La  $1\alpha$ -hidroxilasa ha sido reportada en muchas células y tejidos incluyendo los de próstata, pecho, colon, pulmón, células  $\beta$  pancreáticas, monocitos y células paratiroides (fig. 6).<sup>22</sup>



**fig. 5** Síntesis, activación y catabolismo de la vitamina D3. La vitamina D3 es producido en la piel por la división fotolítica de 7-dehidrocolesterol seguido por la isomerización termal. La vitamina D3 es transportada a el hígado vía suero, donde la vitamina D3 esta unida a una proteína, y donde es convertida a 25-hidroxitamina D3, el mayor metabolito en circulación de la vitamina D3. El paso de activación final,  $1\alpha$ -hidroxilación, ocurre principalmente, pero no es exclusivo, en el riñón formando la  $1,25$ -hidroxivitamina D3, la forma hormonal de la vitamina. La inactivación del catabolismo es llevado a cabo por la 24-hidroxilasa, que cataliza una serie de pasos de oxidación produciendo división de la cadena lateral. (Modificado de 18)

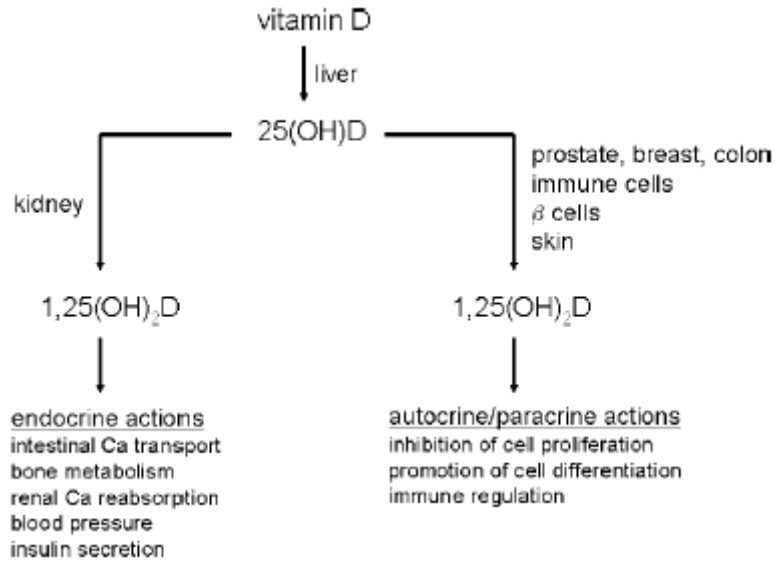


fig. 6 la producción de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> renal y extrarenal sirve a funciones endocrinas, autócrinas y parácrinas.

## TRANSPORTE DE LA VITAMINA D

Los metabolitos de la vitamina D son moléculas lipofílicas con baja solubilidad acuosa que deben ser transportados a circulación unidos a proteínas plasmáticas. La más importante de estas proteínas acarreadoras es la proteína que une a la vitamina D, DBP (D binding protein), que une a los metabolitos con una alta afinidad en el orden de 25(OH)D = 24,25(OH)2D > 1,25(OH)2D > vitamina D<sup>23</sup>. El nivel en plasma de DBP es 20 veces más alto que la cantidad de metabolitos de vitamina D, y el 99% de compuestos de vitamina D en circulación están unidos a proteínas, principalmente a DBP, aunque la albúmina y las lipoproteínas contribuyen en menor grado.<sup>18</sup>

## ACCIONES DE 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-VDR.

La mayoría de las actividades biológicas 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> requieren de un receptor de alta afinidad, el VDR, un miembro antiguo de la superfamilia de receptores nucleares para hormonas esteroides. Como los otros miembros de la familia de receptores esteroides, el VDR actúa como un factor de transcripción<sup>24</sup>. La figura 7

describe el dominio del VDR involucrado en el punto principal para el control de VDR en el gen de transcripción: 1) unión al ligando; 2) heterodimerización con el receptor retinoideo X (RXR); 3) unión del heterodímero a los elementos de respuesta de la vitamina D (VDREs) en el promotor de genes sensibles a  $1,25-(OH)_2D$  y 4) reclutamiento de las proteínas nucleares interactuando con VDR (correguladores) en el complejo de iniciación transcripcional, que realiza marcadamente o suprime la proporción de transcripción del gen por el VDR.

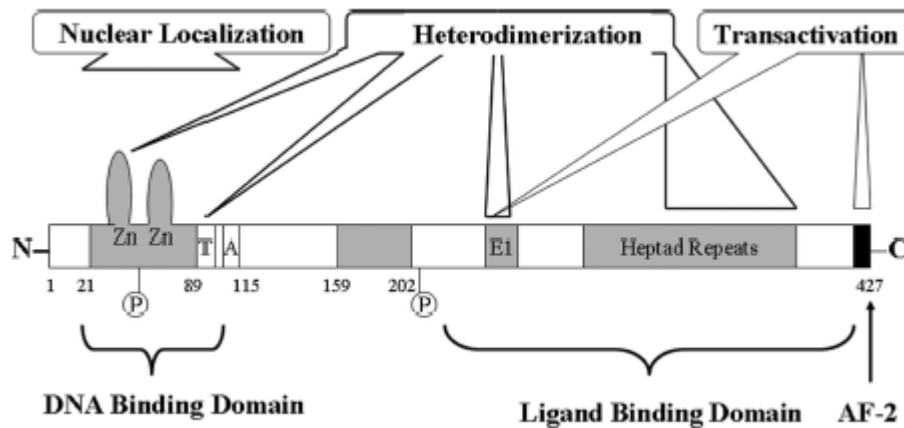


Fig. 7 Dominios funcionales del receptor de la vitamina D (VDR). Se muestra la representación esquemática de los dominios de la molécula de VDR mediante la unión del ligando y al DNA, localización nuclear, heterodimerización con el receptor retinoideo X (RXR) y transactivación, así como también los 2 sitios mayores de fosforilación. Función-2 de activación, AF-2. (modificado de 18)

El dominio que une al ligando LBD (ligand binding domain) localizado en el COOH-terminal de la molécula de VDR, es responsable del enlace de alta afinidad del  $1,25-(OH)_2D_3$  ( $K_d = 10^{-10}$  a  $10^{-11}M$ ). El anillo A contiene el grupo  $1\alpha$ -hidroxilo es una porción crítica de la molécula  $1,25-(OH)_2D_3$  responsable del enlace al VDR.

En la unión del ligando, la recalibración de la hélice 12 en el COOH-terminal de el dominio de unión al ligando de VDR, conocido como función-2 de activación dependiente del ligando, imparte un mayor cambio conformacional en la estructura tridimensional del VDR. Este paso de activación parece ser requerido para el reclutamiento por las proteínas motoras de VDR<sup>25</sup>, responsables para una rápida translocación de VDR citoplásmico al núcleo a través de los microtúbulos<sup>26</sup>.

## ACCIÓN DE LA 1,α-HIDROXILASA

La producción de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  por macrófagos está regulada de una manera completamente diferente a la que es producida por células de riñón, en donde la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  es producida para la absorción de calcio y homeostasis de hueso<sup>27</sup>.

La  $1\alpha, 25$ -dihidroxitamina  $\text{D}_3$  (calcitriol) regula propiedades funcionales y de diferenciación de los fagocitos mononucleares<sup>28</sup>, así como de la homeostasis mineral en hueso. La acción combinada de varios factores de transcripción, que median las señales de diferenciación, determinan la expresión del gen del linaje específico y subsecuente diferenciación celular<sup>29,9</sup>. CD14 se expresa en la superficie de monocitos/macrófagos y está altamente expresado durante la diferenciación de precursores monocíticos a monocitos<sup>29</sup>. Aunque el mecanismo exacto de diferenciación aún no está definido<sup>28</sup>, existen evidencias de que existen otros elementos reguladores más allá del promotor de CD14 responsable de la expresión durante la diferenciación del monocito<sup>29</sup>.

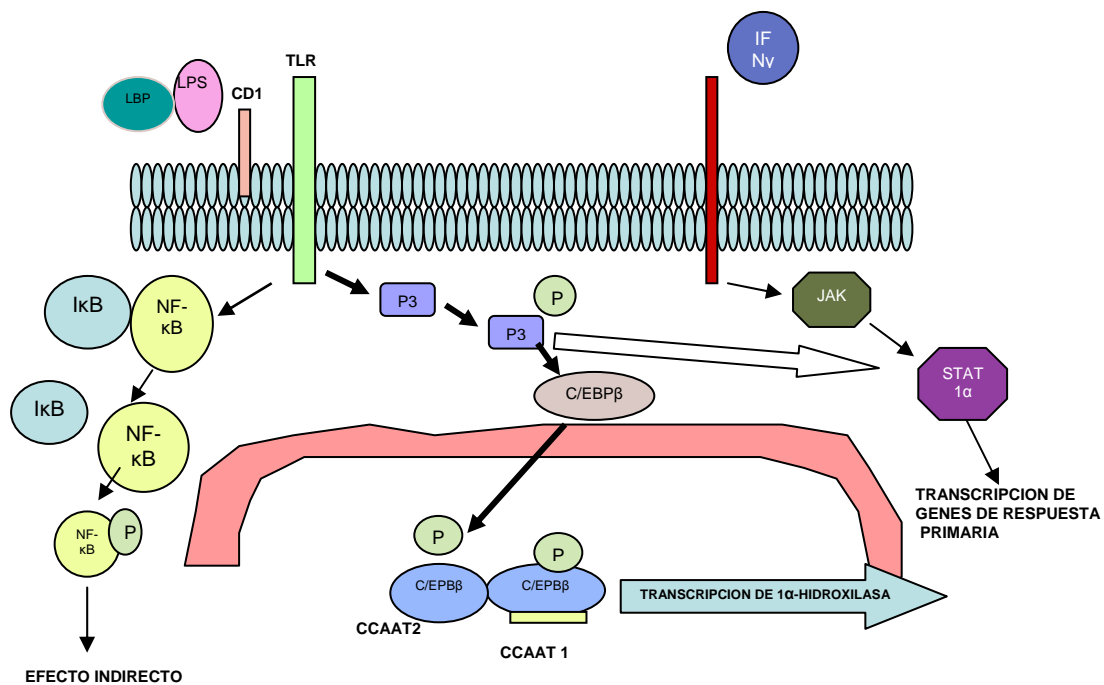
En experimentos con monocitos de sangre periférica se encontró expresión de mRNA de  $1\alpha$ -hidroxilasa sinérgicamente inducible por activación combinada de IFN $\gamma$  y CD14/TLR4. Esta sobrerregulación tiene correlación con la actividad enzimática de  $1\alpha$ -hidroxilasa y producción de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en monocitos<sup>30</sup>.

Un factor de transcripción esencial en la señalización por interferon es STAT1 $\alpha$ . Una vez enlazado el IFN $\gamma$  a su receptor las cinasas JAKs son activadas y STAT1 $\alpha$  se fosforila en la Tyr701. Sin embargo, no hay un efecto directo importante de STAT1 $\alpha$  a través del sitio GAS en el promotor de  $1\alpha$ -hidroxilasa que se haya detectado. Por lo tanto, el efecto de IFN $\gamma$  en la sobrerregulación de  $1\alpha$ -hidroxilasa es más bien un efecto indirecto, posiblemente por regulación de otros factores, tal como C/EBP $\beta$ .

Se conoce que el enlace CD14/TLR4 activa la ruta de NF- $\kappa$ B. En su forma inactiva, NF- $\kappa$ B es enlazado por miembros de la familia I $\kappa$ B en el citoplasma. Los diversos estímulos que activan a NF- $\kappa$ B causan fosforilación de I $\kappa$ B, que es seguido por su ubiquitinación y subsecuente degradación. Esto resulta en la exposición de las señales de localización nuclear en subunidades de NF- $\kappa$ B y la

subsecuente translocación de la molécula al núcleo. En el núcleo, NF- $\kappa$ B enlaza a una secuencia consenso (5'-GGGAC-TTTCC-3') de varios genes y así activa su transcripción.

El promotor de 1 $\alpha$ -hidroxilasa contiene una caja consenso CCAAT, que es un sitio de reconocimiento para C/EBP $\beta$ . C/EBP $\beta$  es un factor de transcripción involucrado en muchos procesos inmunológicos, que pueden ser activados por diversas señales, incluyendo LPS y el mismo IFN- $\gamma$ . La fosforilación de diversos residuos de serina y treonina regulan la actividad de C/EBP $\beta$ . C/EBP $\beta$  también contiene un dominio regulatorio. La fosforilación en este dominio reduce la transcripción de la actividad transcripcional. Diversas cinasas han sido reportadas por fosforilar a C/EBP $\beta$ , incluyendo a ERK1/2, proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina (fig. 8).<sup>28</sup>



**Fig 8.- Modelo propuesto para la inducción de 1 $\alpha$ -hidroxilasa en monocitos de sangre periférica. (Modificado de 28)**



## ACCIONES BIOLÓGICAS DE VITAMINA D

El sistema endocrino de la vitamina D es un componente esencial de las interacciones entre el riñón, hueso, glándula paratiroidea e intestino (resumido en la fig. 9) que mantienen los niveles de calcio extracelular dentro de límites estrechos, un proceso vital para la fisiología normal celular e integridad esquelética.<sup>18</sup>

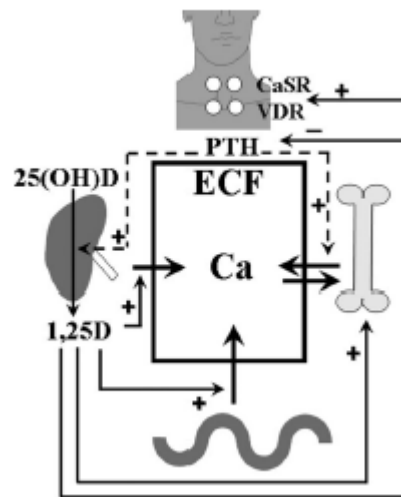


fig. 9 Papel de  $25\text{(OH)}_2\text{D}_3$  en la homeostasis de calcio. La  $25\text{(OH)}_2\text{D}_3$  producido en riñón induce la absorción de calcio intestinal, controla la remodelación ósea, suprime la función paratiroidea (síntesis de la hormona paratiroidea (PTH) y crecimiento celular), y la reabsorción renal de calcio para mantener calcio en el fluido extracelular (ECF) dentro de los límites esenciales para la fisiología normal celular e integridad esquelética. (Modificado de 18)

### INTESTINO:

La vitamina D es esencial para intensificar la eficiencia de absorción de calcio y fósforo de dieta en el intestino delgado.

El  $1,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$  induce la captación activa de calcio celular y mecanismos de transporte, como se muestra en la fig. 6. La captación de calcio requiere de la bomba de calcio epitelial TRPV6 (también conocido como CaT1 o ECaC2) y, en menor grado, TRPV5 (ECaC1). Después de esto, calbindina D transporta calcio a

través de la célula y el ATPasa de  $\text{Ca}^{+2}$  de plasma de membrana, PMCA1b y el permutador de  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  median la entrega final de calcio al torrente sanguíneo<sup>31</sup>.

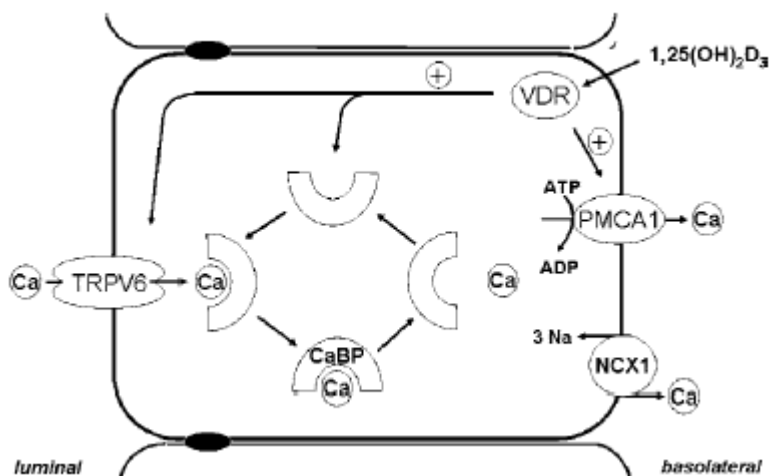


fig. 10 Regulación de transporte de calcio epitelial por  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . El transporte de calcio epitelial es estimulado por  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  por inducción de 1) el canal de calcio apical (TRPV6 o TRPV5) que intensifica la entrada de calcio, 2) la proteína enlaza el calcio citosólico (CaBP; calbindina) que facilita el movimiento de calcio a través de la célula, y 3) la ATPasa (PMCA1) bombea calcio de la célula al basolateral, del calcio del plasma de membrana. (Modificado de 18)

La captación inicial de calcio es el paso que limita la tasa de absorción de calcio en el intestino y es altamente dependiente de vitamina D (fig. 10)<sup>31</sup>.

ESQUELETO: La vitamina D es esencial para el desarrollo y mantenimiento de la mineralización del esqueleto. La deficiencia de vitamina D produce raquitismo en animales jóvenes en crecimiento y osteomalacia en adultos.<sup>18</sup>

GLANDULAS PARATIROIDES: La vitamina D del sistema endocrino es un potente modulador de la función paratiroidea.

La modulación de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  de la glándula paratiroidea en respuesta al calcio involucra la inducción directa de  $1,25\text{D-VDR}$  del gen de transcripción de CaSR a los 2 VDREs en el promotor CaSR<sup>33,34</sup>.

RIÑÓN: El efecto endocrino más importante de  $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$  en el riñón es un control firme de su propia homeostasis a través de la supresión simultánea de  $1\alpha$ -hidroxilasa y estimulación de 24-hidroxilasa y muy probablemente a través de su habilidad de inducir la expresión de megalina en el túbulo proximal<sup>35</sup>.

## JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Las células del Sistema Fagocítico Mononuclear juegan un papel muy importante en la regulación de la respuesta inmunológica, así mismo, desempeñan una gran variedad de funciones efectoras que forman parte de los mecanismos de defensa del organismo.

La capacidad de estas células para llevar a cabo la gran diversidad de funciones depende del estado de diferenciación-activación que posee la célula al momento del estímulo. Dicho estado está gobernado por la influencia o acción de diversos factores inductores de diferenciación que se localizan en el microambiente celular.

Para estudiar los efectos de un agente determinado, debemos contar con poblaciones celulares homogéneas. Esto es posible usando modelos celulares de diferenciación *in vitro* que partan de una sola línea celular. Por resultados previos de nuestro laboratorio sabemos que el tratamiento con el metabolito activo de la vitamina D3 (dihidroxi-vitamina D3, VitD3) induce un aumento significativo en la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG por células monocíticas THP-1.

Como un paso inicial para el estudio de la cascada de eventos moleculares responsables de los cambios producidos por agentes inductores de diferenciación en las células del sistema fagocítico mononuclear, es necesario caracterizar *in vitro*, bajo las condiciones de trabajo de nuestro laboratorio, los efectos de la VitD3 sobre algunas propiedades de la línea celular monocítica THP-1, que pueden cambiar en la diferenciación. Esto nos permitirá correlacionar las modificaciones en la expresión de ciertos genes, a través de la cuantificación de proteínas de membrana y de secreción con los posibles cambios morfológicos y funcionales que se observan.

Dado que la alteración en los niveles de expresión de los receptores para Fc se asocian con padecimientos y enfermedades autoinmunes e inmunohematológicas, además se cree que los FcR participan como vía de entrada para agentes infecciosos tales como el VIH, es importante conocer el

mecanismo de activación del FcR para obtener elementos que coadyuven a la prevención de enfermedades y potenciar la actividad inmunológica.

## **HIPÓTESIS**

Al someter a células monocíticas THP-1 al tratamiento con VitD3 se inducirá diferenciación fenotípicamente. Con ésto aumentará la capacidad fagocítica de estas células y se observarán cambios en las moléculas asociadas al motivo ITAM de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar cómo el estado de maduración de células monocíticas THP-1, puede influir en la activación de las vías bioquímicas involucradas en la activación celular a través de los receptores para anticuerpos.

## **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- 1) Determinar el efecto del tratamiento con VitD3 sobre las características morfológicas en células monocíticas THP-1, observadas al microscopio.
- 2) Identificar moléculas que se asocian a péptidos sintéticos que representan las secuencias ITAM de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII en células monocíticas THP-1 sometidas o no al tratamiento con VitD3.
- 3) Identificar moléculas que se asocian a los péptidos sintéticos que representan las secuencias ITAM de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII en células monocíticas THP-1 después del entrecruzamiento de los receptores Fc, tratadas y no tratadas con VD3.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **CULTIVO CELULAR**

Las líneas celulares THP-1 se cultivaron en medio RPMI adicionado con suero fetal de bovino (SFB) (GIBCO BRL, USA) a una concentración final del 10%. Al medio de cultivo se adicionaron 10µl/ml de aminoácidos no esenciales (Sigma Cell culture, USA) y piruvato de sodio 10 µl/ml (Sigma Cell culture, USA). Los cultivos se mantuvieron en la incubadora (Forma Scientific, USA) a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad en saturación.

### **DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* CON VD3**

La diferenciación celular se indujo cultivando  $2 \times 10^6$  células/ml con 100 nM de vitamina D3 durante 72 hrs. Después del tratamiento, las células adherentes se desprendieron mediante pipeteo suave y tanto las células adherentes como las no adherentes se utilizaron para los experimentos.

### **ELECTROFORESIS (SDS-PAGE)**

La electroforesis SDS-PAGE se realizó de acuerdo al método de Laemmli, excepto que la concentración del gel concentrador fue de 4.5%. Las concentraciones finales en el gel separador fueron de 0.375 M Tris-HCl (Sigma Chemical, Co. U.S.A.) (pH 8.9 y 0.1% p/v de SDS, y las concentraciones de acrilamida fueron de 12.5% y 10% p/v) Los geles se polimerizaron por la adición de 0.05% p/v de persulfato de amonio (Sigma Chemical, Co. U.S.A.) y tetrametiletileno-diamina (TEMED), (Sigma Chemical, Co. U.S.A.) para el gel separador ó 0.1% de cada catalizador en el gel concentrador. El buffer de corrida (pH 8.3) contuvo 0.025 M Tris, 0.192 M glicina. Se utilizaron marcadores de peso preteñidos (Gibco, U.S.A.) en el rango de 200 a 16 kDa.

La electroforesis se realizó con un voltaje constante de 85V por 2 horas en una cámara vertical (ATTO)



## **INMUNOBLOT**

Las proteínas separadas mediante electroforesis SDS-PAGE fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa según el método de Kyhse- Andersen en un aparato de transferencia semiseca, a corriente constante de 125 mA durante 1.5 horas utilizando para este fin buffer de transferencia La membrana de nitrocelulosa con las proteínas inmovilizadas se bloqueo con albúmina bovina al 3% (p/v) en buffer TBS durante toda la noche a 4°C.

Todas las membranas fueron incubadas con el anticuerpo antifosfotirosina conjugado con peroxidasa (1:2000) durante 1.5 horas. Una vez transcurrido el tiempo de la incubación las membranas se lavaron 5 veces con TBS-Tween (apéndice 8) por 5 min. cada una y se reveló utilizando quimioluminiscencia (Pierce, USA).

Para determinar la identidad de las proteínas fosforiladas se eluyeron los anticuerpos de la membrana de nitrocelulosa incubándola en buffer de elución (0.1 M glicina, 5% SDS, pH 2.5) durante 1 hora a 70°C. Se lavó cinco veces con TBS-T y se bloqueo en las condiciones arriba señaladas. Se incubaron con anticuerpos específicos para diferentes proteínas y se reveló con quimioluminiscencia.

## **ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS POR ENTRECruzAMIENTO DE RECEPTORES Fc.**

$2 \times 10^6$  células THP-1 fueron cultivadas *in vitro* con medio RPMI en presencia o ausencia de VD3 por 72 h. Las células se incubaron con 10 µg/ml de anticuerpo anti-FcγRI (32.2) por 10 min a 4°C. Para inducir la agregación, las células fueron resuspendidas en 1 ml de medio RPMI con SFB al 2% y se le agregaron 10 µg/ml de anticuerpo de conejo IgG anti-ratón por 5 min a 37°C. La estimulación fue detenida agregando 500 µl de TBS frío. Las células se lisaron y las proteínas citoplásmicas se incubaron por 3 h con los péptidos γ y γP (FcγRI).

## **PRECIPITACIÓN CON PÉPTIDOS SINTÉTICOS**

**Lisis celular.** Las células estimuladas al inducir la agregación de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII se incubaron en buffer de lisis (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% T-X100, 20 mM ortovanadato de sodio, 10 mM Leupeptina, 10% aprotinina, 2 mM PMSF) durante 15 min a 4°C, se centrifugaron y los sobrenadantes fueron utilizados para incubarse con los péptidos sintéticos, previamente acoplados a esferas de agarosa con estreptavidina (Sigma), durante 2 horas a 4°C con agitación constante.

**Análisis de proteínas unidas a los péptidos sintéticos.** Las proteínas eluidas de las esferas de agarosa-estreptavidina se separaron mediante SDS-PAGE y fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa. Se procesaron las membranas como arriba se indico para revelar por quimioluminiscencia.

**Péptidos sintéticos.** Los péptidos sintéticos que se utilizaron para precipitar las proteínas representan las secuencias ITAM del Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIIA. Estos péptidos fueron sintetizados por Genemed Synthesis, Inc. (San Francisco Ca, USA) tienen acoplada biotina en el extremo amino para que los péptidos se puedan unir a las esferas de agarosa-estreptavidina (Tabla 2).

## RESULTADOS

### 1) ASOCIACIÓN DE PROTEÍNAS AL MOTIVO ITAM DE LOS RECEPTORES Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII DE CÉLULAS THP-1

Para determinar qué moléculas se asocian al motivo ITAM de los receptores Fc $\gamma$ R, 2 X 10<sup>6</sup> células THP-1. Se lisaron y las proteínas del citoplasma contenidas en el sobrenadante se incubaron con los péptidos, previamente acoplados a esferas de agarosa,  $\gamma$ ,  $\gamma$ P (fosforilado), 2A y 2AP (fosforilado) que representan el motivo ITAM de Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIIa respectivamente (tabla 2). Las proteínas fueron separadas en geles SDS-PAGE y transferidas a membrana de nitrocelulosa y las proteínas fosforiladas en tirosina fueron visualizadas por quimioluminiscencia. Los resultados muestran que las proteínas fosforiladas se unen únicamente al péptido  $\gamma$ P con pesos moleculares en un rango de 50 a 150 KDa (fig. 11A). Al péptido 2AP no se unieron proteínas fosforiladas en tirosina con estas condiciones de ensayo. La membrana fue tratada en medio ácido (Glicina 0.1M, SDS 5%, pH 2.5) para eluir los anticuerpos y analizar la presencia de la cinasa Syk (72 kDa). El resultado muestra que Syk se unió únicamente a  $\gamma$ P (fig. 11B)

Tabla 2 Secuencia de péptidos que representan el motivo ITAM de Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIIa.

Fc $\gamma$ RI	
$\gamma$	biotina-EKSDG <b>V</b> <u>Y</u> TGLSTRNQET <b>Y</b> ETLKHE
$\gamma$ P	biotina- EKSDG <b>V</b> <u>Y</u> *TGLSTRNQET <b>Y</b> *ETLKHE
Fc $\gamma$ RIIa	
2A	biotina- ETADGG <b>Y</b> <u>M</u> TLNPRAPTDDDKNI <b>Y</b> LTLP
2AP	biotina-ETADGG <b>Y</b> * <u>M</u> ILNPRAPTDDDKNI <b>Y</b> *LTLP

Secuencia ITAM consenso YXXL X(6,7) YXXL

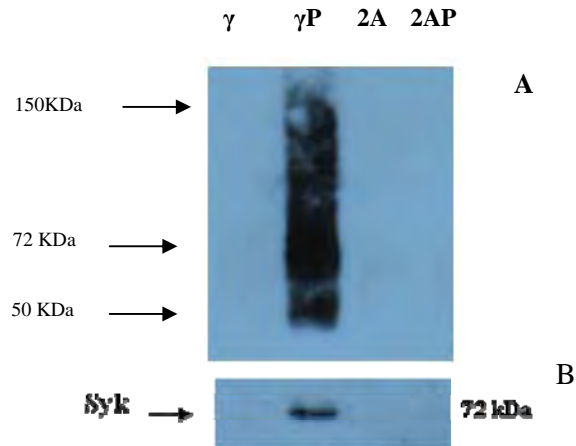


Fig. 11 Asociación de proteínas a los péptidos que representan el motivo ITAM fosforilado y sin fosforilar de la cadena  $\gamma$  del  $Fc\gamma RI$  y  $Fc\gamma RIa$ .  $2 \times 10^6$  de células THP-1 se incubaron en RPMI suplementado con suero fetal de bovino, se lisaron con buffer hipotónico e inhibidores; las proteínas del citoplasma contenidas en el sobrenadante se incubaron con los péptidos  $\gamma$ ,  $\gamma P$  ( $Fc\gamma RI$ ); 2A y 2AP ( $Fc\gamma RIa$ ). Las proteínas citoplásmicas fueron separadas mediante la técnica SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. 11A) las proteínas fosforiladas en tirosina fueron visualizadas por quimioluminiscencia. 11B) la membrana fue tratada en medio ácido para eluir los anticuerpos y analizar la presencia de Syk (72 KDa).

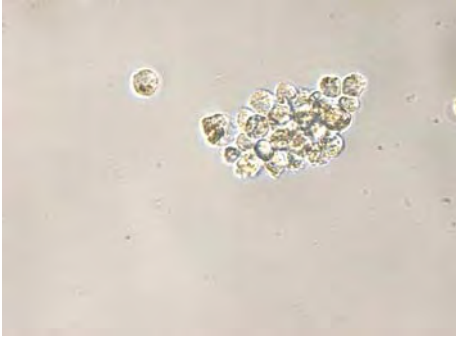
## 2) CÉLULAS THP-1 INDUCIDAS A LA DIFERENCIACIÓN CON VITAMINA D3.

Las células monocíticas THP-1 fueron tratadas con vitamina D3 (100 nM) para inducir cambios morfológicos y funcionales para determinar si las proteínas unidas al motivo ITAM sufren algún cambio por este tratamiento.  $2 \times 10^6$  de células fueron cultivadas *in vitro* en presencia de VD3 durante 72 para obtener poblaciones diferentes. Las células THP-1 se caracterizan por ser células agregadas en forma de racimo y presentar bordes lisos en su pared celular (fig.12A) a diferencia de las THP-1 tratadas con VD3 que mostraron un cambio en la morfología como: disociación celular, formación de pseudópodos y adherencia a la caja de cultivo (fig. 12B).

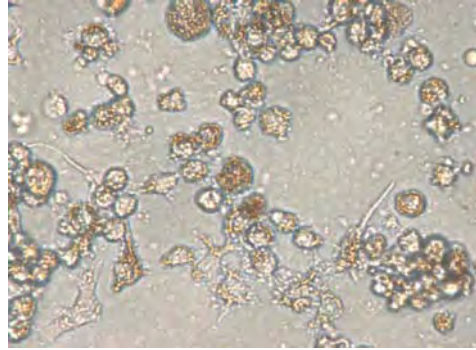
Las células se lisaron con buffer hipotónico y se incubaron con los péptidos  $\gamma$ ,  $\gamma P$ , 2A y 2AP. Las proteínas fosforiladas en tirosina fueron analizadas mediante blot anti-fosfotirosina (fig. 13A), donde se observa que éstas se unen únicamente al péptido  $\gamma P$  en un rango de 50 a 150 kDa. En el caso del péptido 2AP no hubo unión de proteínas fosforiladas en tirosina bajo estas condiciones de ensayo. Fig. 13B) la membrana fue tratada en medio ácido para eluir los

anticuerpos y analizar la presencia de Syk (72 kDa); el resultado muestra que Syk se unió únicamente al péptido  $\gamma$ P.

A



B



**Fig. 12 Tratamiento de células monolíticas THP-1 con 10 nM de vitamina D3. 12A) Células THP-1 sin tratar. 12B) Células THP-1 tratadas con VD3 durante 72h. El cambio en la morfología y adherencia de las células fueron observadas en un microscopio invertido con cámara.**

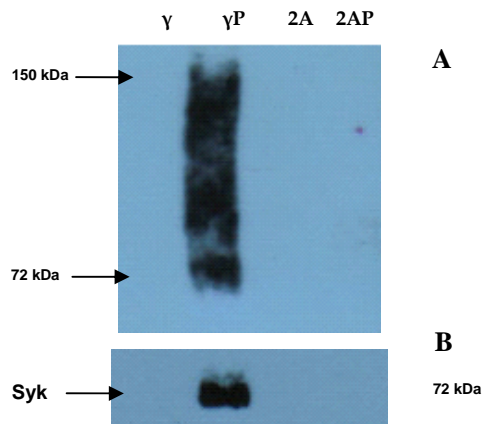


Fig. 13 Tratamiento de células monocíticas THP-1 con vitamina D3.  $2 \times 10^6$  células de THP-1 fueron incubadas con 100 nM de vitamina D3 por 72 h. Las células fueron lisadas con buffer hipotónico e inhibidores; las proteínas del citoplasma contenidas en el sobrenadante se incubaron con los péptidos  $\gamma$ ,  $\gamma^P$  (Fc $\gamma$ RI), 2A y 2AP (Fc $\gamma$ RIIa). 13A) las proteínas fueron separadas mediante la técnica SD-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Mediante inmunoblot se analizaron las proteínas fosforiladas en tirosina donde la membrana fue incubada con anticuerpos anti-fosfotirosina (PY20 y PY99) y visualizadas por quimioluminiscencia. Fig. 13B) la membrana fue tratada en medio ácido para eluir los anticuerpos y analizar la presencia de Syk (72 KDa).

### 3) CÉLULAS THP-1 TRATADAS CON VD3 Y ESTIMULADAS CON ANTICUERPO 32.2 PARA INDUCIR AGREGACIÓN DEL RECEPTOR Fc $\gamma$ RI.

Para determinar si hay un cambio en la fosforilación de las proteínas unidas al motivo ITAM de células THP-1 después de ser tratadas con VD3 las células THP-1 fueron estimuladas con anticuerpo Fc $\gamma$ RI (32.2) para entrecruzar receptores Fc. Para el análisis de las proteínas que se unen a los péptidos que representan el ITAM de Fc $\gamma$ RIIa (2A y 2AP) fosforilado y no fosforilado, se aumentó la cantidad de proteína para determinar si la cantidad de ésta afecta la observación de los resultados, por lo que se usaron  $4 \times 10^6$  células.

Las proteínas unidas a los péptidos fueron separadas mediante SD-PAGE al 10% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las proteínas fosforiladas en tirosina fueron analizadas mediante blot anti-fosfotirosina. Los resultados obtenidos muestran que las proteínas se unen al péptido  $\gamma^P$  tienen pesos moleculares en un rango de 70 a 90 kDa (fig. 14A). Para el péptido 2AP no hubo

unión de proteínas fosforiladas en tirosina con  $2 \times 10^6$  de células, pero para  $4 \times 10^6$  se observan las proteínas fosforiladas en un rango de 40 a 72 kDa aproximadamente (fig. 15). Las membranas fueron tratadas en medio ácido para eluir los anticuerpos y analizar la presencia de Syk que se encuentra unida a los péptidos en todos los casos (fig. 14B y 16).

SHP-1 es una proteína tirosina fosfatasa y se ha demostrado que se une a la cinasa Syk para regular su actividad. Para determinar si esta fosfatasa es capaz de unirse al motivo ITAM, la membrana fue eluida nuevamente en medio ácido y se analizó la presencia de la proteína SHP-1. En la fig. 14C se observa que SHP-1 se une al motivo ITAM de  $Fc\gamma RI$  presente y se observa una diferencia en la cantidad de proteína cuando las células son tratadas con VD3 y se induce la agregación del receptor  $Fc\gamma RI$ . Para el  $Fc\gamma RII$  sólo se observa unión de SHP-1 al motivo ITAM que representa a  $Fc\gamma RII$  sin fosforilar (péptido 2A) (fig. 17).

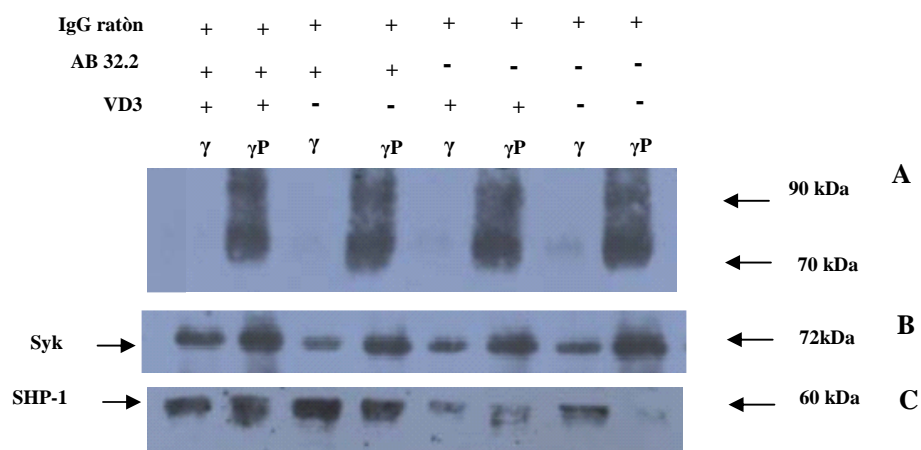


Fig. 14 Agregación de receptores  $Fc\gamma RI$  en células monocíticas THP-1 tratadas (+) y no (-) con VD3.  $2 \times 10^6$  células de THP-1 fueron incubadas en presencia y ausencia de 100 nM de vitamina D3 por 72 h. Las células fueron estimuladas con anticuerpo  $Fc\gamma RI$  (32.2) (10  $\mu g/ml$ ) y agregadas con anticuerpo anti-ratón por 5 min a 37°C. Las células fueron lisadas con buffer hipotónico e inhibidores y las proteínas del citoplasma se incubaron con los péptidos  $\gamma$  y  $\gamma P$  ( $Fc\gamma RI$ ). Las proteínas unidas al péptido fueron separadas mediante SD-PAGE y transferidas a membrana de nitrocelulosa. Fig. 14A) se analizaron las proteínas fosforiladas en tirosina por inmunoblot con anticuerpos anti-fosfotirosina (PY20 y PY99). 14B) la membrana fue tratada en medio ácido (SDS 5%, pH 2.5) para eluir los anticuerpos y analizar la presencia de Syk (72 kDa). 14C) la membrana fue eluida nuevamente y se analizó la presencia de SHP-1 (60 kDa).

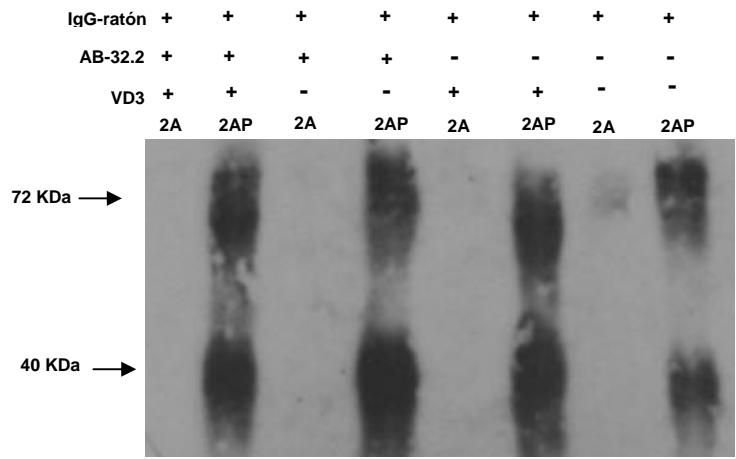


Fig.15 Blot anti-pY. Estimulación de células monocíticas THP-1 tratadas y no tratadas con VD3.  $4 \times 10^6$  células de THP-1 fueron incubadas con y sin 100 nM de vitamina D3. Para inducir agregación del receptor  $Fc\gamma RI$  se incubaron las células con anticuerpo 32.2 durante 10 min a 4°C y con IgG anti-ratón durante 5 min.

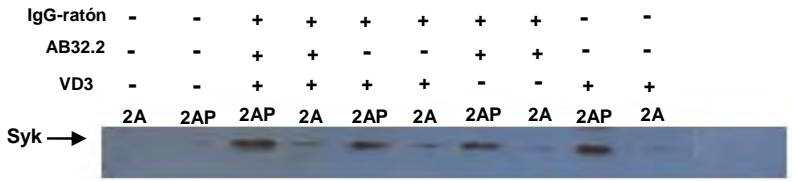


Fig. 16 Blot anti-Syk Una vez analizadas las proteínas fosforiladas con PY20 y PY99, la membrana fue tratada en medio ácido (SDS 5% , pH 2.5) para eluir los anticuerpos y analizar la presencia de Syk (72 KDa).



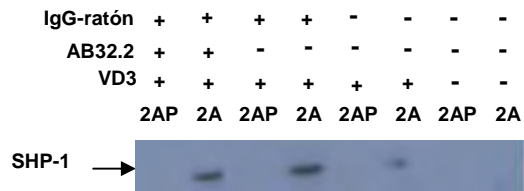


Fig. 17 Blot anti-SHP-1 Una vez analizadas las proteínas con anti-Syk, la membrana fue tratada en medio ácido (SDS 5% , pH 2.5) para eluir los anticuerpos y analizar la presencia de SHP-1 (60 kDa).

#### 4.- COMPARACIÓN DE UNIÓN DE SYK

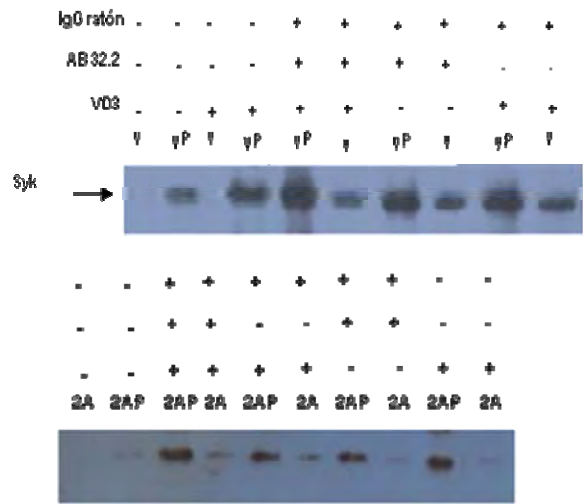


Fig. 18 Comparación de unión de Syk al péptido  $\gamma$  y  $\gamma$ P con las distintas estimulaciones y tratamientos.

Fig. 19 Comparación de unión de Syk al péptido 2 y 2A con las distintas estimulaciones y tratamientos

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La  $1\alpha, 25$ -dihidroxitamina  $D_3$  (calcitriol) regula propiedades funcionales y de diferenciación de los fagocitos mononucleares<sup>28</sup>, así como de la homeostasis mineral en hueso. La acción combinada de varios factores de transcripción, que median las señales de diferenciación, determinan la expresión del gen del linaje específico y la subsecuente diferenciación celular<sup>29,9</sup>. Se ha demostrado que el calcitriol induce la expresión de los genes de diferenciación en los monocitos inmaduros, además regula su paso a macrófagos maduros. Se sabe que el enlace de antígenos o partículas cubiertas con IgG a la superficie celular de monocitos y macrófagos, induce una fosforilación rápida y transitoria de tirosinas de polipéptidos de diferente peso molecular<sup>36</sup>. Debido a que la activación de Syk es un paso importante en la señalización en monocitos y macrófagos y ya que no se han estudiado los eventos bioquímicos que ocurren en el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos, decidimos analizar la unión de proteínas fosforiladas al ITAM de los receptores Fc y si existen cambios en los niveles de fosforilación tanto por el tratamiento con VD3 así como por el estímulo por el entrecruzamiento de los receptores Fc.

En la fig.11 se observa el patrón basal de fosforilación en tirosina sin agregación de los receptores y sin tratamiento con VD3 que muestra la unión de proteínas al ITAM fosforilado únicamente, en un rango de peso de 50 a 150 kDa (fig. 11A) observándose que se unen más de 1 proteína al ITAM fosforilado. Estos resultados indican que la señalización se inicia con la fosforilación de tirosinas en el modulo ITAM y la unión de distintas moléculas a los motivos ITAM. Se ha demostrado la capacidad de los receptores para inducir funciones efectoras que se anula completamente si los ITAM son eliminados o si se cambian los residuos de tirosina de los ITAM por residuos de fenilalanina<sup>37,38</sup>. Cuando las células fueron tratadas con VD3 se observó que el patrón de proteínas unidas al motivo ITAM varía y se observa una sola banda amplia, en un rango de 72 a 150 kDa (fig. 13A). Se sabe, por experimentos previos realizados en nuestro laboratorio, que el tratamiento de células THP-1 con VD3 estimula la formación rápida de segundos mensajeros como ceramidas, cAMP, inositoles y calcio; por activar una variedad de proteínas

quinasas incluyendo PKC, Raf, MAPK y cinasas de la familia Src<sup>8</sup>. Se ha demostrado que al motivo ITAM fosforilado se unen diversas proteínas cinasas de la familia Src como pueden ser Fgr, Fyn, Lyn, Hck, Yes y Src. En nuestros resultados se observó también un incremento significativo en la unión de la proteína Syk (fig. 13B); por lo que se puede inferir que la cinasa Syk participa en los cambios funcionales de monocito a macrófago. Es probable que Syk active a otras proteínas que participan en la extensión de la membrana así como en la adhesión celular, como pueden ser paxilina, talina, vinculina,  $\alpha$ -actina, proteína cinasa C $\alpha$ , MARCKS, MacMARCKS, ceramidas, cAMP, inositoles y calcio.

Numerosas proteínas son fosforiladas en residuos de tirosina cuando los Fc $\gamma$ Rs son entrecruzados en la superficie celular. Es conocido que Syk juega un papel importante en las vías de señalización activadas por el entrecruzamiento de Fc $\gamma$ Rs y es considerada una de las proteínas iniciadoras de la cascada de activación después del entrecruzamiento de los FcRs. Actualmente se desconoce el mecanismo exacto de la activación de las proteínas iniciadoras de la cascada de activación (quinasas de la familia Src y Syk) y cómo se ven afectadas por el tipo de Fc $\gamma$ R entrecruzado, así como el estadio celular. Los eventos inducidos por la agregación del receptor Fc $\gamma$ RI fue el reclutamiento de proteínas con peso molecular de 70 kDa y 90 kDa aproximadamente, que se unen al ITAM (fig. 14A), a los 10 min de incubación. La proteína de aproximadamente 70 kDa se determinó que es la proteína cinasa Syk (fig 14B) y la proteína de peso aproximado de 90 kDa pudiera ser la proteína p85, una de las subunidades de la cinasa PI3 que participa en la vía de señalización PI3K para inducir fagocitosis. Se ha reportado que los primeros eventos en la fase de enlace de los receptores a la membrana celular, se une Lyn o Lck de la familia Src, esta unión se da fuertemente entre los 5 y 10 min de la agregación de los receptores<sup>36</sup>; una vez fosforilado el ITAM, recluta a la cinasa Syk que fosforila a la subunidad p85 reguladora de fosfatidilinositol 3-cinasa que activa, a su vez, la subunidad catalítica p110 $\beta$  de PI3-K generando PI-3,4,5-trifosfato de PI-4,5-bifosfato en la membrana cerca del complejo del receptor formando la copa fagocítica<sup>39</sup>. Se considera que a

diferentes pasos del proceso de fagocitosis existen proteínas fosforiladas y desfosforiladas a diferentes tiempos; y algunas permanecen fosforiladas durante este proceso y algunas por más tiempo, pero aún se desconoce el mecanismo exacto.

Se ha reportado que cuando el receptor  $Fc\gamma$  es coagregado, el ITAM citoplásmico sufre fosforilación en tirosina y puede reclutar proteínas que contengan dominios SH2. En la fig. 14C se observa un aumento gradual de unión de proteínas SHP-1 al ITAM y el grado de unión, depende del estímulo al que sean sometidas las células, esto es, si las células son inducidas a diferenciación, en este caso con VD3, existe cierto grado de expresión de SHP-1. Se ha mencionado que SHP-1 participa quizá regulando la desfosforilación de proteínas que pudieran estar participando en diversas vías de activación, por ejemplo Grb2, Stat1, Jak1, CBL<sup>40</sup>. Otra posibilidad es que SHP-1 este regulando la desfosforilación uniéndose directamente a las tirosinas fosforiladas del ITAM<sup>41</sup>; pero también existe la posibilidad de que SHP-1 se encuentre unida a Syk y que su vez Syk se encuentre unida al ITAM, esta teoría se apoya con los resultados obtenidos por nuestro laboratorio donde SHP-1 coprecipita con Syk<sup>8</sup>. También cabe mencionar que para que haya expresión de SHP-1 debe haber un estímulo de los receptores  $Fc\gamma$ , esto se infiere haciendo una comparación con el estado basal donde no existe la presencia de SHP-1.

Tras el entrecruzamiento del receptor  $Fc\gamma RI$  (32.2) y agregación con anticuerpo anti-IgG se observa una mayor cantidad de proteína de SHP-1 (fig. 14C) en comparación con células tratadas con VD3. Se sabe que los receptores que contienen ITIM pueden actuar como reguladores negativos de la señalización iniciada por receptores que contienen ITAM<sup>42</sup> Una vez agregados los receptores por el anticuerpo anti-IgG, son fosforiladas las tirosinas del ITAM por las cinasas de la familia Src y en estas tirosinas fosforiladas se une la cinasa Syk, al asociarse Syk a las secuencias ITAM es fosforilada en residuos de tirosina por cinasas de la familia Src. En estos sitios fosforilados, distintas proteínas se asocian a Syk a través de sus dominios SH2. Syk se asocia físicamente y es sustrato de la fosfatasa SHP-1. En

ensayos *in vitro*, por nuestro laboratorio, se observó que la asociación de SHP-1 al receptor Fc $\gamma$ RIIB depende del grado de fosforilación de las secuencias ITIM y de la densidad del receptor<sup>8</sup>. Una vez agregado el receptor Fc $\gamma$ R, el receptor Fc $\gamma$ RIIB es agrupado indirectamente, su tirosina contenida en el ITIM es fosforilada por Lyn, lo que representa un sitio de enlace para SHP-1 que regula negativamente la vía de señalización desfosforilando a Syk.<sup>40</sup>

Dentro del mecanismo de fagocitosis mediado por Fc $\gamma$ Rs que contienen ITAM, se sabe que Cbl es fosforilado después de la estimulación de Fc $\gamma$ R y así mediar la señal río abajo para los factores intercambiadores de nucleótidos, como C3G y Sos, y luego para GTPasas tales como RAP, RAS y RAC, debido a su asociación con proteínas adaptadoras tales como CRKL y Grb2. Se ha reportado que Cbl aboga la interacción de CBL-CRKL, este hecho se da mediante la interacción de SHP-1 en la activación de Rac inducido por ITAM, un evento bioquímico que ha sido implicado en eventos de polimerización de actina y fagocitosis.

Numerosos estudios han identificado una variedad de participantes moleculares y eventos bioquímicos involucrados en la transducción por Fc $\gamma$ Rs. Poco interés se le ha dado al estudio de cómo se ve afectado un tipo individual de Fc $\gamma$ R estimulando a los eventos bioquímicos por otro tipo de Fc $\gamma$ R y considerando el estado de diferenciación/activación celular. Uno de nuestros objetivos fue observar el comportamiento de Fc $\gamma$ RII ante la agregación de Fc $\gamma$ RI; en la fig. 15 se observa fosforilación de proteínas con peso molecular que van de 40 – 72 kDa, tras la agregación de Fc $\gamma$ RI con y sin tratamiento con VD3, sólo unidas a los péptidos fosforilados que representan a Fc $\gamma$ RII. A nivel basal no se observaron proteínas unidas a los ITAMs de Fc $\gamma$ RII (fig. 1A) quizá porque requiere necesariamente de un estímulo para activar su maquinaria de señalización. Sabemos, por resultados de nuestro laboratorio, que el Fc $\gamma$ RII señala cuando la célula se estimula con Fc $\gamma$ RI o Fc $\gamma$ RIII<sup>8</sup>, el Fc $\gamma$ RI no media la fagocitosis eficientemente, tanto como el Fc $\gamma$ RII, ya que falla en la activación de las isoformas nuevas de PKC, así como la vía de PÍ-3K<sup>8</sup> por lo que se cree que de manera sistemática el Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII llevan a cabo la fagocitosis, y quizá también participan otros receptores contenidos en la misma célula. No se sabe

con certeza la relación que guardan entre el número y diferentes receptores agregados para determinar la respuesta de fagocitosis, así como tampoco se sabe si influyen otros factores como diferencia en la conformación del receptor, afinidad del ligando, estructura del dominio citoplásmico, entre otros. Se sabe que cuando se estimula a las células THP-1 por Fc $\gamma$ RII induce un incremento significativo en los niveles de fosforilación de Syk<sup>43</sup> y en nuestros resultados después de la agregación de Fc $\gamma$ RI también se activa Syk como se observa en la fig. 16, al parecer el ITAM es importante para la unión de Syk y que se formen los complejos necesarios para inducir un aumento en la fagocitosis.

Por resultados de nuestro laboratorio sabemos que la diferenciación de las células THP-1 con VD3 a las 72 h, disminuye la asociación basal de Syk y SHP-1<sup>43</sup> por lo que nos hace suponer que Syk se encuentra más disponible y por lo tanto se puede unir al modulo ITAM como lo observamos en la fig. 16. En contraste para las células sin diferenciar hubo más asociación de SHP-1 con Syk por lo que observamos menos unión de Syk al modulo ITAM (fig. 17); estos datos sugieren que SHP-1 regula de manera negativa a Syk defosforilandolo y dependiendo del ligando que se esté entrecruzando, esta asociación se ve afectada, ya que cuando se entrecruzó a Fc $\gamma$ RII sin diferenciar, produjo un incremento en la interacción entre SHP-1 y Syk.

## CONCLUSIONES

- Existen más de un tipo de proteínas unidas al ITAM fosforilado.
- Syk se activa tanto en la diferenciación de monocito a un fenotipo a macrófago, como en el evento de entrecruzamiento de Fc $\gamma$ RI, por lo que quizá Syk sea una molécula clave en la transducción de señal llevada a cabo por FcR.
- La VD3 disminuye la asociación basal entre Syk y SHP-1.
- La agregación del receptor Fc $\gamma$ RI activa al receptor Fc $\gamma$ RIIa.
- SHP-1 regula la fosforilación de Syk y por lo tanto la unión al ITAM en el Fc $\gamma$ RII, pero para Fc $\gamma$ RI no afecta su fosforilación.
- Para que haya expresión de SHP-1 debe haber un estímulo de los receptores Fc $\gamma$ .

## **PERSPECTIVAS**

- \_ Inducir entrecruzamiento del Fc $\gamma$ RII en células THP-1 y analizar su efecto antes y después del tratamiento con VD3.
- \_ Analizar la posible translocación de Syk al núcleo.
- \_ Analizar las proteínas de la familia Src que están participando.
- \_ Determinar la participación de la proteína SHP-1 tanto para Fc $\gamma$ RI como para Fc $\gamma$ RII.
- \_ Determinar qué moléculas son las que participan en cada evento de señalización.



## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Ezekowits. Uptake of *Pneumocistis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature*. 1991. **351**:155-158.
- 2.- Wright SD. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein, *Science*. 1990. 249:1431-1433.
- 3.- Abbas A. K. *Inmunología Celular y Modular*, 4º, McGraw-Hill. España. 2002, 280-302.
- 4.- Allen LA, Aderem A. Mechanisms of phagocytosis. *Curr. Opin. Immunol*. 1996. **8**: 36-40.
- 5.- Daeron M. Fc Receptor Biology. *Annu. Rev. Immunol*. 1997. **15**: 280-302.
- 6.- Imhof BA. Adhesion mechanism regulating the migration of monocytes. *Nature*, 2004. **4**:432-444.
- 7.- Sánchez MG and Rosales C. . Signal transduction by immune-globulin Fc receptor. *Journal of Leukocyte Biology*. 1998. **63**: 521-33.
- 8.- Santoyo RG. Estudio de las vías bioquímicas involucradas en la señalización mediada por los Fc $\gamma$ R. Tesis Maestría 2004. Facultad de Química, UNAM, México.
- 9.- Nuñez GL. Determinación de la expresión de los receptores Fc $\gamma$ RI y II, CD14, HLA-DR y CR3 así como de la fagocitosis en monocitos humanos aislados a partir de sangre periférica durante su diferenciación con VD3. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México.
- 10.- Radaev S, Sun P. Recognition of immunoglobulins by Fc $\gamma$  receptors. *Molecular Immunology*. 2001. **38**:1073-1083.
- 11.- Flores BF, Santiago E. y Weiss-Steider B.. Receptores Fc $\gamma$  en salud y enfermedad. *Rev. Invest Clin*. 1998, **50**: 529-40.
- 12.- Keegan AD, William EP. Multichain immune recognition receptors: similarities structure and signaling pathway. *Immunol. Today*. 1992, 13:63.
- 13.- Isakov N. Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking and Fc receptors to their signaling cascades. *J. of Leuk. Biol*. 1997. **61**:6-16.
- 14.- May RC, Machesky LM. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. cell. Science*. 114:1061:1077.
- 15.- Latour S, Zhang RP. and Veillette A., A unique insert in the linker domain of Syk is necessary for its function in immunoreceptor signaling. *The EMBO journal*, 1998, **17**: 2584-2595.

- 16.- Mahabele Shwar GH, Kundu GC. Syk, a protein-tyrosine, suppresses the cell motility and nuclear factor  $\kappa$ B-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator by inhibiting the phosphatidylinositol 3'-kinase activity in breast cancer cells. *J. of Biol. Chem.* 2003. **278**:6209-6221.
- 17.- Siraganian RP, Zhang J. Protein tyrosine kinase Syk in mast cell signaling. *Mol. Immunol.* 2001. **38**:1229-1233.
- 18.- Nagpal S, Nas S. Non-calcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocrine reviews.* 2005. 1:83.
- 19.- Khun R, Lohler J. Interleukin-10 deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 1998. **75**:263-274.
- 20.- Gross C, Stamey T. Treatment of early recurrent prostate cancer with 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol). 1998. *J. Urol.* **159**:2035-2040.
- 21.- Koisumi T, Nakaa Y. effect of corticosteroid and 1,25-dihydroxy-vitamin D3 administration and autoimmune disease in MRL/MRL-Lpr/1pr mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1985. **77**:396-404.
- 22.- Huckins D, Felsu DT. Treatment of psoriatic arthritis with oral 1,25-dihydroxyvitamin D3: A pilot study. *Arthritis Rheum.* 1990. **33**:1723-1727.
- 23.- Borrguet W, Ruff M. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature.* 1995. **375**:377-382.
- 24.- Tobler A, Gasson J. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Sensitive and receptor regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in normal human peripheral blood lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 1987. **79**:1700-1705.
- 25.- Bortman P, Fogueira MA. Antiproliferative effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on breast cells. *J Med Biol.* 2002. **35**:1-9.
- 26.- Kerner SA, Scott RA. Sequence elements in the human osteocalcin gene confer basal and inducible response to hormonal vitamin D3. *Science.* 1989. **86**:4455-4459.
- 27.- Slatopolsky E, Brown AJ. Vitamin D analogs for the treatment of secondary hyperparathyroidism. 2002. *Blood Purif.* **20**:109-112.
- 28.- Moeenrezakhanlou A, Nandan D.  $1\alpha,25$ -Dihydroxycholecalciferol activates binding of CREB to a CRE site in the CD14 promoter and drives promoter activity in a phosphatidylinositol-3 kinase-dependent manner. *Journal of Leukocyte Biology*, 2007; **81**:1311-1321.
- 29.- Pan Z, Hetherington JH, CCAAT/Enhancer-binding Protein Activities the CD14 Promoter and Mediates Transforming Growth factor  $\beta$  Signaling in

Monocyte Development Journal of Biological Chemistry and Molecular Biology, 1999; **274**:23342-23248.

30.- Stoffels K, Overbergh L, Immune Regulation of 25-Hydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -Hydroxylase in Human Monocytes. Journal of Bone and Mineral Research, 2006; **21**:37-47.

31.- Makishima M, Lu TT. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid receptor. Science. 2002. **296**:1313-1316

32.- Enepekides DJ, Black M. The independent and combined effects of RAR-, RXR-, and VDR-selective ligands on the growth of squamous cell carcinoma in vitro. J. Otolaryngol. 1999. **28**:83-89

33.- Kremer R, Karaplis AC, Henderson J. Regulation of parathyroid hormone-like peptide in cultured normal human keratinocytes. Effect of growth factors and 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on gene expression and secretion. J. Clin. Invest. 1991. **87**:884-893

34.- Fraser RA, Rossignol M. Sug1, a putative transcriptional mediator and subunit of the PA700 proteasome complex, is a DNA helicase. J. Biol. Chem. 1997. **272**:7122-7126

35.- Camarasa JM, Ortonne JP. Calcitriol shows greater persistence of treatment effect than betamethasone dipropionate in topical psoriasis therapy. J. Dermatolog. 2003. Treat. **14**:8-13.

36.- Strzelecka KA, Kwiatkowska K. Lyn and Syk kinases are sequentially engaged in phagocytosis mediated by Fc $\gamma$ R. J of Immunol. 2002. **169**:6787-6794.

37.- Reth M. Antigen receptor tail clue. Nature. 1989. 338:383.

38.- Park JG, Conserved cytoplasmic tyrosine residues of the gamma subunit are required for a phagocytic signal mediated by gamma-R111A. 1993, J Clin. Invest. **92**:113-120

39.- Swanson JA, Hoppe AD. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. Society Leuk. Biol. 2004. **76**:1-11.

40.- Kant Ma, De P. SHP-1 regulates Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis and the activation of RAC. Am. Soc. of Hem. 2002. **100**:1852-1859.

41.- Huan ZY, Hunter S. The effect of phosphatases SHP-1 and SHIP-1 on signaling by the ITIM- and ITAM-contained Fc $\gamma$  receptors Fc $\gamma$ R11B and Fc $\gamma$ R11A. J of Leuk. Biol. 2002. **22**: 823-829.

42.- Gergely J, Pecht I. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-bearing receptors regulate the immunoreceptor tyrosine-based activation motif-induced activation of immune competent cells. Immunol. 1999. **68**:3-15.

- 43.- Agramonte HJ, Hallal C.  $1\alpha$ , 25-Dihydroxy-vitamin D3 alters Syk activation through Fc $\gamma$ RII in monocytic THP-1 cells. *J of Cell Bioch.* 2003. 89:1056-1076.
- 44.- Cox D, Greenberg S. Phagocytic signaling strategies: Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis as a model system. *Imm.* 2001. **13**:339-345.
- 45.- Hallal C, Agramonte HJ. Syk and Lyn phosphorylation induced by Fc $\gamma$ RI and Fc $\gamma$ RII crosslinking is determined by the differentiation state of U-937 monocytic cells. *Imm.* 2005. **99**:169-179.
- 46.- Turner M, Schweighoffer. Tyrosine kinase Syk: essential functions for immunoreceptor signaling. *Imm. Today.* 2000. **21**:148-154.
- 47.- Yamashita T, Suzuki R. Differential dephosphorylation of the Fc $\gamma$ R ITAM tyrosines with dissimilar potential activating Syk. *J Blood Cell.* 2008. 1-15.
- 48.- Hsueh RC, Hammill AM. Activation of the Syk tyrosine kinase is insufficient for downstream signal transduction in B lymphocytes. *BMC Immunol.* 2002. 3-16.
- 49.- Pan XQ, Darby Ch. Activation of three classes of non receptor tyrosine kinases following Fc $\gamma$  receptor crosslinking in human monocytes. *Clin. Immunol.* 1999. **90**:55-64.
- 50.- Tassioulas I, Hu X. Amplification of IFN- $\alpha$ -induced STAT-1 activation of inflammatory function by Syk and ITAM-adaptors. *N. Immunol.* 2004. **5**:1181-1189.
- 51.- Attas ChJ, Lowry M. Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr and Lyn. *J. Exp. Med.* 2000. **191**:669-681.
- 52.- Sonderrmann P, Kaiser J. Molecular basis for immune complex recognition: A comparison of Fc-receptor structures. *J Mol Biol.* 2001. **309**:737-749.
- 53.- Tsujikawa K, Ichijo T. Regulation of Lck and Fyn tyrosine kinase activities by transmembrane protein tyrosine phosphatase leukocyte common antigen-related molecule. *Mol. Cancer R.* 2002. **1**:155-163.
- 54.- Fütterer K, Wong J. Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide. *J. Mol. Biol.* **281**:523-537.
- 55.- Atwell S, Adams J. A novel mode of gleevec binding is revealed by the structure of spleen tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 2004. **279**:55827-55832.
- 56.- Davis RS, Ehrhardt GRA. An extended family of Fc receptor relatives. *Eur. J. Immunol.* 2005. **35**:674-680.

- 57.- Ding Y, Xu G. Crystal structure of the ectodomain of human Fc $\alpha$ RI. *J. Biol. Chem.* 2003. **278**:27966-27970.
- 58.- Suzuki T, Kono H. Differential involvement of Src family kinases in Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis. *J. of Immunol.* 2000. **165**:473-482.
- 59.- Hewison M, Freeman L. Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *J. of Immunol.* 2003. **170**:1382-1390.
- 60.- Hogarth PM. Fc receptors are major mediators of antibody based inflammation in autoimmunity. *Curr. Opin. in Immunol.* 2002. **14**:798-802.
- 61.- Amigorena S, Bonnerot Ch. Fc receptors for IgG and antigen presentation on MCH class I and class II molecules. *Sem. in Immunol.* 1999. **11**:385-390.
- 62.- Pasquier B, Launay P. Identification of Fc $\alpha$ RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of Fc $\gamma$ RI ITAM. 2005. **22**:31-42.
- 63.- Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 2001. **19**:275-290.
- 64.- Jefferis R, Lund J. Interaction sites on human IgG-Fc for Fc $\gamma$ R: current models. *Immuno. Letters.* 2002. **82**:57-65.
- 65.- Moon KD, Post CB. Molecular basis for a direct interaction between Syk protein-tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *J. of Biol. Chem.* 2004. **280**:1543-1551.
- 66.- Kwiatkowska K, Frey J. Phosphorylation of Fc $\gamma$ RIIA is required for the receptor-induced actin rearrangement and capping: the role of membrane rafts. *J. of Cells Sc.* 2002. **116**:537-550.
- 67.- Takai T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. Review. 2002. **2**:580-592.
- 68.- Kane H, Suzuki T, Spatial raft coalescence represent an initial step in Fc $\gamma$ R signaling. *J. of Immunol.* 2002. **169**:193-203.
- 69.- Roskoski R. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Bioch. And Biophy. Research Commun.* 2004. **324**:1155-1164.
- 70.- Kato K, Fridman CS. Structural bases of the interaction between IgG and Fc $\gamma$  receptors. *J. Mol. Biol.* 200. **295**:213-224.
- 71.- Ottinger EA, Botfield MC. Tandem SH2 domains confer high specificity in tyrosine kinase signaling. *Am. Soc. for Bioch. and Mol. Biol.* 1997. **273**:729-735.
- 72.- Oudijk IV, Beckkle MW. Funtional differences two Fc receptor ITAM signaling motifs. *Blood J.* 2009.**86**:3302-3307.

- 73.- Ganesan LP, Fang H. The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif of Fc $\gamma$ RIIa to modulate signaling events in myeloid cells. *J. Biol. Chem.* 2003. **278**:35710-35717.
- 74.- Crowley MT, Costello PS. A critical role for Syk transduction and phagocytosis mediated by Fc $\gamma$  receptors on macrophages. *J. Exp. Med.* 1997. **186**:1027-1039.
- 75.- Latour S, Veillette A. Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling. *Curr. Op. Immunol.* 2001. **13**:299-306.
- 76.- Luanfeng P, Peng P. Signaling transduction by IgG receptors. *Ch. Med. J.* 2003. **116**:487-494.
- 77.- Barrow AD, Trowsdale J. You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signaling. *Eur. J. Immunol.* 2006. **36**:1646-1653.
- 78.- Sankarshanan M, Ma Z. Identification of a novel lipid raft-targeting motif in Src homology 2-containing phosphatase 1. *J. of Immunol.* 2007. **179**:483-490.
- 79.- Gurlek A, Pittelkow MR. Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3: implications in cell growth and differentiation. *Endoc. Reviews.* 2002. **23**:763-786.
- 80.- Mönch KT, Jacobsen L Ch. The transcriptional program of terminal granulocytic differentiation. *Am. Soc. of Hem.* 2005. **105**:1785-1796.
- 81.- Melendez AJ, Gillooly DJ. Aggregation of the human high affinity immunoglobulin G receptor (Fc $\gamma$ RI) activates both tyrosine kinase and G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998. **95**:2169-2174.
- 82.- Greenberg S, Chang P. Clustered Syk tyrosine kinase domains trigger phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996. **93**:1103-1107.
- 83.- Kim MK, Pan XQ. Fc $\gamma$  receptors differ in their structural requirements for a interaction with the tyrosine kinase Syk in the initial steps of signaling for phagocytosis. *Cli. Imm.* 2001. **98**:125-132.
- 84.- Kim MK, Huang ZY. Fc $\gamma$  receptors transmembrane domains: role in cell surface expression,  $\gamma$  chain interaction, and phagocytosis. *Blodd.* 2003. **101**:4479-4484.
- 85.- Beningo KA, Wang Y. Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target. *J. Cells Sci.* 2002. **115**:849-856.

86.- Kliche S., Lindquist J.A., Schraven B. Transmembrane adapters: structure, biochemistry and biology. *Seminars of Imm.* 2004. **16**:367-377.

87.- Randall S.D., Goetz R.A.E., Chuen-M L. An extended family of Fc receptor relatives. *Eur. J. Immuno.* 2005. **35**:674-680.

88.- Makishima M., Kanatani Y. Enhanced of activity of  $1\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> for growth inhibition and differentiation induction of human Myelomonocytic Leukemia Cells by tretinoin tocoferil, and  $\alpha$ -tocopherol ester of all-trans retinoic acid. *Bood*, 1996. **87**:3384-3394.

89.- Zimmer A., Chedeville A. Functional interactions between bile acids, all-trans retinoic acid, and 1,25-Dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> on monocytic differentiation and Myeloblastin gene down-regulation in HL60 and THP-1 human Leukemia Cells. *Cancer Research*. 2000. **60**:672-678.

90.- Canning M., O., Grotenhuis K.  $1-\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> ( $1,25$  (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes. *Europ. J. of Endocrinology*. 2001. **145**:351-357.

## ABREVIATURAS

-CR3	.....	Receptor tipo 3 de complemento
-FcγR	.....	Receptor de la inmunoglobulina G
-IgG	.....	Inmunoglobulina G
-ITAM	.....	Motivo de activación del inmunoreceptor de base tirosina
-ITIM	.....	Motivo de inactivación del inmunoreceptor de base tirosina.
-HEPES	.....	Acido 4-(2-hidroxiethyl)-1 piperazinetosulfónico
-HLA	.....	Antígeno tipo humano
-NK	.....	Asesina natural
-PTK	.....	Proteína tirosina cinasa
-SH2	.....	Homología a Src 2
-SH3	.....	Homología a Src 3
-SFB	.....	Suero fetal de bobino
-VD3	.....	1-α,25-dihidroxi vitamina D3



## ANEXO

### PBS 20X (Solución amortiguadora de fosfatos)

2.6 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	.....	7.2 g
7.74 mM Na <sub>2</sub> hpo <sub>4</sub> anhidro	.....	22 g
0.16 mM NaCl	.....	175 g
Agua destilada	.....	1 L
pH 7.4 ajustar con NaOH (lentejas)		

### PBS 1X

PBS 20X	.....	25 mL
Agua mili Q cbp	.....	500 mL
pH 7.4 NaOH/HCl	.....	

### Solución de lisis hipotónico

Hepes 20 mM	.....	2.0 mL
KCl 10 mM	.....	2.0 mL
Ortovanadato de sodio	.....	2.0 µL
EDTA 0.1 mM	.....	200 µL
Glicerol	.....	2.0 mL
PMSF 0.1 M	.....	200 µL
Apotina	.....	20 µL
Pepstatina	.....	200 µL
FNa 0.1 M	.....	400 µL
DTT	.....	150 µL
NP40	.....	40 µL
Pirofosfato de sodio	.....	800 µL
Leupeptina	.....	200 µL

### Solución stock HEPES-EDTA 100X

EDTA 100 Mm	.....	5.722 g
HEPES 1M	.....	23.83 g
Agua destilada	.....	100 mL
pH 7.4 ajustar con NaOH		

### Solución stock VD3 100 µM 1000X

1- $\alpha$ , 25 hidroxivitamina D3	.....	50 µg
Etanol (p.a.)	.....	1.2 mL
Conserva a -80 °C protegido de la luz		

### **-Medio RPMI 1640**

Medio RPMI deshidratado	.....	1 sobre
-------------------------	-------	---------

NaHCO <sub>3</sub>	.....	2.2 g
HEPES 25 mM	.....	5.9575 g
2 Mercaptoetanol (Dil. 1:100 en H <sub>2</sub> O)	.....	7.8 µL
Agua Mili Q cbp	.....	1 L
pH 7.4 - 7.6 ajustar con NaOH		

**-Solución stock de TBS**

Tris 1 M	.....	20 mL
NaCL 5 M	.....	30 mL
Agua destilada cbp	.....	1 L
pH 7.5 ajustar con NaOH/HCl		

**-TBS-TWEEN**

TBS stock	.....	500 mL
Tween	.....	500 µL