

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“EFECTO DE IL-10 E IFN γ SOBRE LOS MECANISMOS
MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA FAGOCITOSIS
MEDIADA POR Fc γ R EN CÉLULAS MONOCÍTICAS”**

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. DULCE AURORA FRAUSTO DEL RÍO

Tutor: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO



MÉXICO, D.F., marzo 2012



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 80301) y DGAPA UNAM (IN222008). Durante sus estudios, Dulce Aurora Frausto Del Río recibió beca del CONACyT (203458 y 16414).

COMITÉ TUTORAL

Dr. Enrique Ortega Soto
Dr. Ricardo Lascurain Ledesma
Dra. Gloria Soldevila Melgarejo

JURADO

Presidente: *Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo*
Vocal: *Dr. Julio Cesar Carrero Sánchez*
Vocal: *Dra. Claudia González Espinosa*
Vocal: *Dra. Martha Robles Flores*
Secretario: *Dr. Enrique Ortega Soto*

*Por tu apoyo incondicional, por tu inagotable amor y
por siempre estar ahí cuando más lo necesito.
Porque te debo lo que soy.
Gracias mamá.*

*A mis hermanas Eli y Gis, y a Poli,
que alegran e iluminan mi vida en todas las formas.
Las quiero muchísimo.*

A Edgar, el amor de mi vida.

INDICE	<i>Páginas</i>
ABSTRACT	5
RESUMEN	6
I. INTRODUCCIÓN	
1. <i>El sistema fagocítico mononuclear</i>	7
1.1 <i>Activación de macrófagos</i>	8
1.2 <i>Funciones efectoras de los monocitos-macrófagos</i>	11
1.3 <i>Fagocitosis</i>	12
2. <i>Receptores para Fc</i>	13
2.1 <i>Receptores para inmunoglobulinas G</i>	15
3. <i>Señalización a través de FcγRs</i>	17
4. <i>Interleucina 10: expresión, receptor, vía de señalización y actividad biológica</i>	24
4.1 <i>Señalización a través de IL10R</i>	25
4.2 <i>Actividad biológica IL-10</i>	25
5. <i>IFNγ: proteína, expresión, receptor, vías de señalización y actividad biológica</i>	26
5.1 <i>Señalización a través de IFNγR</i>	27
5.2 <i>Actividad biológica IFNγ</i>	28
II. HIPOTESIS	31
III. OBJETIVOS	31
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. <i>Reactivos y anticuerpos</i>	32
2. <i>Purificación y cultivo de monocitos humanos</i>	33
3. <i>Inmunofluorescencia indirecta: expresión de FcγRs por citometría de flujo</i>	33
4. <i>Estimulación celular e inmunoprecipitación</i>	34
5. <i>Inmunoblot</i>	35
6. <i>Fagocitosis mediada por FcγRs</i>	35
7. <i>Flujo de calcio por citometría de flujo</i>	36
8. <i>Tinción de F-actina</i>	37
9. <i>Fagocitosis de E. coli</i>	37
10. <i>Pull down de Rac-GTP y Cdc42-GTP</i>	38
V. RESULTADOS	39
VI. DISCUSIÓN	50
VII. CONCLUSIONES	58
BIBLIOGRAFÍA	60

ANEXO

Dulce Frausto-Del Río, et al. Interferon gamma induces actin polymerization, Rac1 activation and down regulates phagocytosis in human monocytic cells. Cytokine 57 (2012) 158-168. doi:10.1016/j.cyto.2011.11.008

ABSTRACT

IFN γ is considered a potent activator and IL-10 a powerful inhibitor of macrophage functions. However, neither all cellular functions are enhanced by IFN γ nor IL-10 inhibits all cellular responses. Thus, Fc γ Rs-mediated phagocytosis in monocyte-derived macrophages (MDMs) increases after IL-10 treatment, and decreases after treatment with IFN γ , although both IL-10 and IFN γ up regulate Fc γ RI expression. To date, the mechanisms by which IL-10 enhances and IFN γ diminishes phagocytosis are not known. In this work we investigated the effect of IFN γ and IL-10 on phagocytic signaling by Fc γ Rs in MDMs. Treatment with IFN γ diminished by 50% the phagocytosis of IgG-opsonized SRBC (IgG-SRBC) while treatment with IL-10 increased it by 80%. These opposite effects cannot be attributed to changes in expression of Fc γ R isoforms induced by each cytokine. IL-10 up regulated the expression of all activatory (Fc γ RI, Fc γ RIIa and Fc γ RIII) and inhibitory (Fc γ RIIb) Fc γ R classes, while IFN γ down regulated Fc γ RIIb and up regulated only Fc γ RI expression. In both IFN γ and IL-10, the activatory/inhibitory balance favors the expression of activatory receptors. Early biochemical responses mediated by Fc γ Rs were distinctly affected by cytokine treatment. The positive effect of IL-10 on phagocytosis and on signaling mediated by Fc γ Rs correlated with the upregulation of the expression of all classes of Fc γ Rs induced by IL-10. On the other hand, the down regulation of phagocytosis induced by IFN γ was not accompanied by suppression of the early biochemical events triggered by Fc γ Rs crosslinking (Syk and rise in [Ca⁺²]_i) (Cox D. *et al.* 1999). Instead, IFN γ induced a higher basal level of F-actin and activation of Rac1, which might be involved in the reduced phagocytic capacity of IFN γ -treated MDMs. The level of F-actin reached after IFN γ treatment was not further increased after stimulation with IgG-SRBC or CCL5, whereas MDMs treated with IL-10 showed a slightly higher F-actin response than control cells to CCL5. PI3K is implicated in the IFN γ signaling cascade involved in actin polymerization since the inhibition of PI3K with LY294002 prevented IFN γ -mediated actin polymerization. Our results suggest that actin polymerization induced by IFN γ affects the macrophage responses not only through Fc γ Rs but also to other stimuli that induce cytoskeleton rearrangement such as phagocytic or chemotactic stimuli.

RESUMEN

El IFN γ es considerado un potente activador e IL-10 un poderoso inhibidor, de las funciones de macrófagos. Sin embargo, ni todas las funciones celulares son aumentadas por IFN γ , ni IL-10 inhibe todas las respuestas de éstas células. Por ejemplo, la fagocitosis mediada por los receptores para IgG (Fc γ Rs) en macrófagos derivados de monocitos (MDMs) aumenta después del tratamiento con IL-10, y disminuye después del tratamiento con IFN γ , aunque tanto IL-10 como IFN γ regulan positivamente la expresión del Fc γ RI. Los mecanismos moleculares a través de los cuales IL-10 induce el incremento de la fagocitosis e IFN γ induce la disminución, no se conocen. En este trabajo se estudió el efecto del IFN γ y de la IL-10 en la señalización que lleva a la fagocitosis mediada por Fc γ Rs en MDMs. Los efectos opuestos observados en la fagocitosis a través de Fc γ Rs no pueden ser atribuidos a los cambios inducidos por IFN γ e IL-10 sobre la expresión de estos receptores. En ambos tratamientos, el balance en la expresión de receptores de activación/inhibición favorece a la activación, sin embargo, las respuestas bioquímicas tempranas mediadas por Fc γ Rs fueron afectadas de manera diferente por las citocinas. El efecto positivo de IL-10 en la fagocitosis y en la señalización mediada por Fc γ Rs correlaciona con la regulación positiva de la expresión de los Fc γ Rs. Por lo que respecta a IFN γ , la regulación negativa de la fagocitosis no fue acompañada por la supresión de los eventos bioquímicos tempranos desencadenados tras el entrecruzamiento de Fc γ Rs (Syk e incremento de [Ca²⁺]_i). Además de ello, el IFN γ indujo el aumento del nivel basal de F-actina y la activación de Rac1, que podrían estar involucrados en la disminución de la capacidad fagocítica de los MDMs tratados con IFN γ . El nivel alcanzado de F-actina después del tratamiento con IFN γ ya no se incrementó en respuesta a la estimulación con eritrocitos opsonizados con IgG (EIgG) o CCL5; mientras que los MDMs tratados con IL-10 mostraron un nivel ligeramente más alto de actina polimerizada en respuesta a CCL5 que las células control. Encontramos también que el IFN γ produce un aumento de los niveles de Rac1-activo, sin modificar los niveles de Cdc42-activo, mientras que el tratamiento con IL-10 no induce la activación ni de Rac1 ni de Cdc42. Ensayos con el inhibidor de PI3K (LY294002) mostraron que PI3K está implicada en la señalización a través de la cual IFN γ polimeriza actina puesto que su inhibición previno la polimerización de actina mediada por IFN γ . Nuestros resultados sugieren que la polimerización de actina y la activación de Rac1 inducida por IFN γ afectan la respuesta a estímulos adicionales que induzcan el rearrreglo del citoesqueleto, y consecuencia de ello es el efecto negativo sobre la fagocitosis.

I. INTRODUCCIÓN

1. El sistema fagocítico mononuclear

El sistema fagocítico mononuclear está formado por los monocitos, sus precursores en la médula ósea y dos poblaciones de células diferenciadas derivadas de los monocitos: los macrófagos y las células dendríticas de origen mieloide (Gordon S. *et al.* 2005; Geissmann F. *et al.* 2010). Todas estas células, como todas las células sanguíneas, provienen de la médula ósea. Los monocitos se originan de un precursor mieloide pluripotencial (Unidad formadora de colonias de granulocitos-eritrocitos-megacariocitos-macrófagos, GEMM-CFU), que se diferencia a un precursor de granulocito-macrófago (Unidad formadora de colonias granulocitos-macrófagos, GM-CFU), luego a precursor monocítico (M-CFU), monoblasto, promonocito y finalmente monocito, el cual abandona la médula ósea y sale a circulación (Bogdan C. 2006). Una vez liberados, los monocitos permanecen en circulación entre 7 y 10 días antes de que algunos de ellos migren a los tejidos y se diferencien a macrófagos residentes o células dendríticas. Los monocitos migran y se instalan en los tejidos donde se transforman en macrófagos, ya sea en condiciones inflamatorias o en homeostasis. El nombre, la morfología y otras características fenotípicas de los macrófagos dependerán del tejido donde residan (Auger M.J. *et al.* 1992; Bogdan C. 2006). 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. Los monocitos se observan al microscopio óptico como células pequeñas de 12-15 μm de diámetro; con núcleo reniforme que ocupa el 50% del volumen de la célula. Durante la transición de monocito a macrófago aumenta su capacidad fagocítica, la expresión de receptores para IgG y moléculas del complemento, y aumentan de tamaño, alcanzando de 25-50 μm de diámetro (Auger M.J. *et al.* 1992).

En los últimos años se han definido tres subgrupos de monocitos circulantes con base en la expresión de CD14, CD16 y CD64: los monocitos $\text{CD14}^{\text{hi}}\text{CD16}^{\text{lo}}\text{CD64}^{\text{+}}$ (llamados monocitos “clásicos” por ser los que poseen la mayoría de las características originalmente descritas para los monocitos) expresan además CD32 y mayor cantidad de CCR2 y CD62L; monocitos $\text{CD14}^{\text{+}}\text{CD16}^{\text{+}}\text{CD64}^{\text{-}}$ que expresan mayor cantidad de MHC II y CD32^{hi} , CD86 y CCR5 (llamados monocitos “residentes”, que se piensa son los que migran a los tejidos en ausencia de inflamación); y monocitos $\text{CD14}^{\text{+}}\text{CD16}^{\text{+}}\text{CD64}^{\text{+}}$ que tienen una gran expresión de CD86 y HLA-DR (estas células combinan características descritas para células dendríticas y monocitos).

Los estudios sobre la heterogeneidad de monocitos de ratón y humano muestran que los monocitos salen de la médula ósea a circulación con el fenotipo clásico. En ausencia de un proceso inflamatorio, adquieren un fenotipo intermedio entre el clásico y el residente. Los monocitos tanto de fenotipo clásico como intermedio pueden responder a señales inflamatorias migrando a tejidos en los que haya procesos inflamatorios en curso, y diferenciarse ahí hacia macrófagos inflamatorios. En ausencia de procesos inflamatorios, los monocitos en circulación cambian hacia el fenotipo residente; estos monocitos pueden migrar a los tejidos para renovar las poblaciones de macrófagos y DCs residentes en tejidos (Gordon S. *et al.* 2005).

Los macrófagos de los tejidos tienen un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis tisular a través de la fagocitosis de células senescentes, y la remodelación y reparación de tejidos después de la inflamación. Los macrófagos de tejidos se derivan de monocitos circulantes, aunque se ha demostrado que en algunos casos los macrófagos tisulares pueden dividirse. Los macrófagos se encuentran presentes en gran número en órganos linfoides, hígado, riñones, tracto gastrointestinal, sistema nervioso central, cavidades serosas, huesos y piel, y participan en un amplio rango de procesos fisiológicos y patológicos (Gordon S. *et al.* 2005).

1.1 Activación de macrófagos

Los macrófagos residentes en los tejidos, así como los monocitos recién emigrados en condiciones inflamatorias, están sujetos a la influencia de factores tanto microbianos como inmunoreguladores. Este microambiente tisular influye en el fenotipo de los macrófagos en cada órgano (Gordon S. *et al.* 2005). A partir de estudios *in vitro*, se ha establecido una clasificación de macrófagos activados de acuerdo al microambiente al que fueron sometidos (M1 y M2) haciendo alusión a la clasificación de las citocinas producidas por linfocitos T CD4⁺ Th1 o Th2 (Mantovani A. *et al.* 2004).

El IFN γ , solo o junto con LPS ó TNF α , induce la activación clásica ó M1. Esta activación clásica es caracterizada por una alta capacidad de presentación de antígeno, alta producción de IL-12 e IL-23 y alta producción de metabolitos tóxicos (óxido nítrico e intermediarios reactivos de oxígeno). Cuando se determinó que las citocinas producidas por linfocitos Th2 generaban fenotipos de activación distintos al clásico, se le denominó genéricamente a este tipo de activación como activación alterna o M2. Sin embargo, se ha demostrado que existen diferentes programas de activación alterna. La activación producida por IL-4 e IL-13 tiene diferencias esenciales con la generada cuando los fagocitos son expuestos a IL-10, por lo que Mantovani propuso se les clasificara

separadamente como M2a y M2c, respectivamente. Los monocitos humanos diferenciados con GM-CSF o M-CSF tienen un fenotipo que es la mezcla de M1 y M2, sin embargo son considerados del mismo grupo que los monocitos cultivados con IL-10, como M2c. Además, se ha identificado un fenotipo alterno diferente, al que Mantovani propuso denominar como M2b. Este fenotipo se genera al tratar a los macrófagos con complejos inmunes y LPS (u otros ligandos de TLRs o IL-1R); estos macrófagos están caracterizados por la alta producción de IL-10 y muy baja de IL-12 (Mantovani A. et al. 2004). En los distintos fenotipos alternos algunas de las funciones efectoras de las células se encuentran reguladas negativamente, sin embargo los fenotipos inducidos son más que una simple desactivación (Mantovani A. et al. 2004).

Los macrófagos M2 se distinguen por la baja producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1, TNF α e IL-6), aunque los macrófagos M2b producen altos niveles de citocinas pro-inflamatorias concomitantemente con una alta producción de IL-10 y baja de IL-12. La IL-10, sola o en combinación con LPS, polariza la activación a M2c, induciendo programas de transcripción que conducen al control y desactivación de la respuesta inmune e inflamación, remodelación de matriz extracelular, y promoción de angiogénesis. Sin embargo la IL-10 es más que un desactivador de macrófagos, pues genera un fenotipo de macrófago cuyas funciones efectoras incluyen la remoción de restos celulares, remodelación del tejido (lo cual quizá tenga que ver con la potenciación de la fagocitosis a través de varios receptores, propiedad que será descrita más adelante) y reparación del tejido (Mantovani A. et al. 2004), todo ello con una característica principal: no se induce inflamación.

Los fenotipos de activación esquematizados en la Figura 1 no representan fenotipos ni finales ni definitivos, pues el grado de plasticidad que puede haber entre los estados de 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 tampoco 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 cual es posible debido a que en un ambiente inflamatorio el macrófago puede estar expuesto a una gran variedad de estímulos (Gordon S. et al. 2005). Es por ello que la polarización de los macrófagos a un fenotipo u otro no debe ser vista como un estado final sino como parte de un continuo de diversos estados funcionales (Mantovani A. et al. 2004).

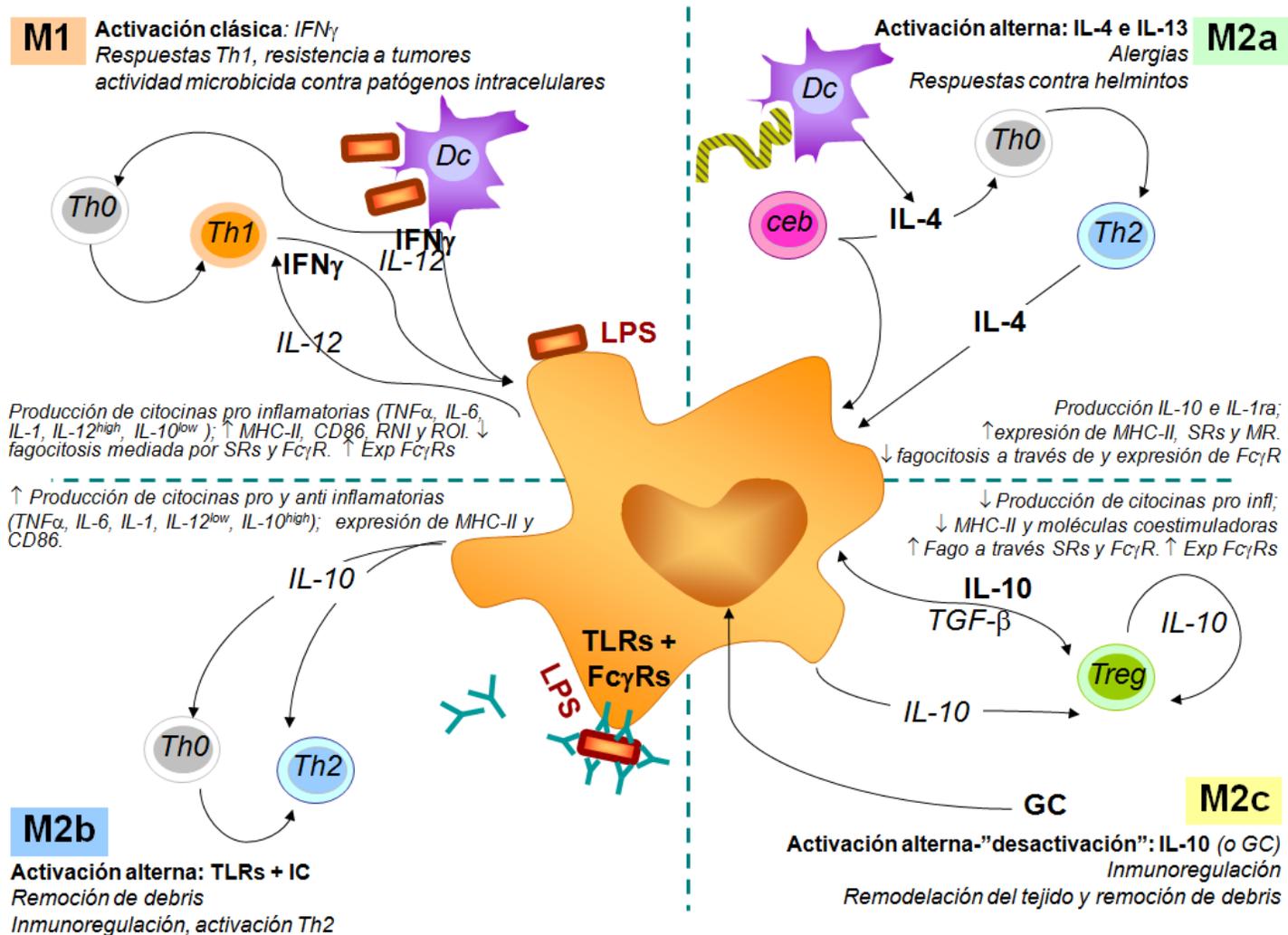


Figura 1. Fuentes de inductores y propiedades funcionales de diferentes poblaciones de macrófagos activados. Se representan algunas de las fuentes probables *in vivo* de citocinas y de otras moléculas inductoras, así como las características funcionales de los fenotipos que los diferentes microambientes inducen. La exposición de macrófagos a $IFN\gamma$ deriva en una polarización M1, con potencial citotóxico y antitumoral, mientras que los macrófagos M2 en general tienden a las actividades de inmunoregulación. La clasificación M2 se subdivide en M2a, M2b y M2c con importantes diferencias entre los fenotipos. Abreviaciones: IC, complejos inmunes; MR, receptor de manosa; RNI, intermediarios reactivos de nitrógeno; ROI, intermediarios reactivos de oxígeno; SRs, receptores scavenger; TLR, receptores tipo Toll (te Velde A. A. *et al.* 1992; Mantovani A. *et al.* 2004; Gordon S. *et al.* 2005; Liu Y. *et al.* 2005; Martinez F. O. *et al.* 2008).

1.2 Funciones efectoras de los monocitos-macrófagos.

Los monocitos y macrófagos llevan a cabo una gran cantidad de funciones biológicas, algunas de ellas descritas ya en párrafos anteriores. Los macrófagos son células con una alta capacidad fagocítica, microbicida, y citotóxica, que procesan antígenos y los presentan 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 del 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. (Bogdan C. 2006)

Los macrófagos secretan hormonas polipeptídicas y esteroides, factores de coagulación (VII, IX, X, V), enzimas (DNAsas, RNAsas, fosfatasas, glicosidasas, sulfatasas, arginasas), glutatión, así como una gran diversidad de factores de crecimiento. Aunque la síntesis de las proteínas del sistema del complemento la llevan a cabo principalmente los hepatocitos, las células de Kupffer también contribuyen a ello bajo el estímulo de IL-1, IL-6 y TNF- α , produciendo el Factor B, Factor D y los componentes C1-C9 (Lappin, 1993). La producción de citocinas por los macrófagos puede ser activada por productos microbianos como LPS, por interacción con células Th1, por factores solubles incluyendo prostaglandinas, leucotrienos, y otras citocinas como IFN γ , etc. (Bogdan C. 2006).

El papel de los macrófagos en el mantenimiento de los tejidos consiste en la reparación y remodelación de los mismos. En el hueso, los osteoclastos son los responsables de la remoción de las células óseas para que puedan ser sustituidas por células nuevas. En el sistema inmune, los monocitos y macrófagos juegan un papel central en la regulación de la respuesta inmune, ya que no sólo procesan y presentan antígeno, también secretan una serie de citocinas y quimiocinas que modulan positiva o negativamente la función linfocítica. Las actividades antimicrobianas de monocitos y macrófagos incluyen sus propiedades antibacterianas, antiparasitarias, fungicidas y antivirales (Lopez-Berestein, 1993) que le confieren la producción de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno y de enzimas proteolíticas. Muy pocas de estas funciones son expresadas constitutivamente, por lo que se requiere una señal exógena, como pueden ser citocinas, la interacción con una célula T o componentes de la matriz extracelular (Bogdan C. 2006).

Para poder llevar a cabo estas actividades los macrófagos cuentan con un vasto repertorio de receptores entre los que destacan los descritos en la **tabla 1**. Los macrófagos expresan además MHC-II y proteínas de membrana que actúan como co-estimuladoras, lo que les confieren la capacidad de presentar antígeno a los linfocitos T (Bogdan C. 2006). Los macrófagos 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 C3b y los receptores para Fc de IgG (FcγR).

Tabla 1. Principales receptores expresados en macrófagos, sus ligandos y sus funciones.

Receptor	Ligandos (ejemplos)	Función
CD14	LPS, LTA muramil dipéptido, péptidoglicano soluble, polisacáridos de pared celular de <i>Streptococcus</i> , lipoarabinomanana micobacteriana, células apoptóticas.	Reconocimiento y fagocitosis de patógenos, y eliminación de células apoptóticas.
CD36(receptor scavenger, familia B)	Colágena tipo I, trombospondina, fosfatidilserina.	Deposición de lipoproteínas-colesterol, unión y eliminación de células apoptóticas.
CR1 CR3 (CD11b/CD18, Mac-1) CR4	C3b, C4b, C3i C3bi, CD54 (ICAM-1); fibrinógeno, ligandos microbianos, oligodesoxinucleótidos C3bi	Internalización de microorganismos opsonizados y sin opsonizar; interacción macrófago-célula T (*CR3); inhibición de producción de IL-12 (CR3)
FcγRs	IgG	Internalización de microorganismos opsonizados, activación (FcγR I, IIA III y IV) o inhibición (FcγR IIB) de macrófagos.
Receptores de manosa	Oligosacáridos de manosa y fucosa	Reconocimiento de patógenos y fagocitosis.
Receptores scavenger clase A	Polianiones (dextran por ejemplo), *LTA, lipoproteínas de baja densidad acetilados u oxidados.	Reconocimiento de patógenos y fagocitosis. Deposito de colesterol(formación de placas arteroescleróticas), inhibición de producción de IL-2.
Proteína reguladora de señal α (SIRPα)	CD47 (integrina asociada a proteína, IAP)	Agregación homotípica de macrófagos; interacción de macrófagos con células T, activación de macrófagos, inhibición de fagocitosis de eritrocitos propios.
TLR2	*LTA, *PGN, *BLP, *MALP; *LAM, lipoproteína de 19-kDa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; levaduras.	Unión a productos microbianos; unión de microbios intactos, activación de macrófagos.
TLR4	*LPS	
TLR5	Flagelina de <i>Listeria monocytogenes</i>	
TLR6	*MALP	
TLR9	Oligonucleótidos bacterianos de CpG	
Receptor de vitronectina (αvβ3)	Trombospondina, vitronectina, laminina, fibronectina	Estimulación de polimerización de actina (fagocitosis de células apoptóticas).

* BLP, lipopéptidos bacterianos, CR, receptor de complemento, LAM, lipoarabinomanana, LPS, lipopolisacárido, LTA, ácido lipoteicoico, MALP, lipopeptido de micoplasma, TLR, receptores tipo Toll. (Modificado de Bogdan C, 2001)

1.3 Fagocitosis

La fagocitosis es un proceso que consiste en la internalización de partículas de diámetro > 0.5 μm, por un mecanismo que involucra el rearrreglo del citoesqueleto de actina. La fagocitosis es crítica para la remoción y destrucción de agentes infecciosos y células senescentes; participa además durante varias etapas del desarrollo embrionario, en la remodelación de tejidos, así como en la respuesta inmune y la inflamación (Aderem A. *et al.* 1999). En las células del sistema inmune la internalización de una partícula a través de fagocitosis es iniciada por la interacción específica de receptores en la superficie de la célula fagocítica con ligandos en la superficie de la partícula. Esto induce la polimerización de actina en el sitio de interacción partícula-fagocito, lo que junto con la participación de otras moléculas, culmina con la internalización de la partícula. Una vez

formado, el fagosoma madura por una serie de eventos de fusión con lisosomas lo que permitirá que la partícula internalizada sea destruida por acción de enzimas proteolíticas (Aderem A. *et al.* 1999). El reconocimiento inicial está mediado por moléculas expresadas por los microorganismos, por ejemplo mananas o LPS (reconocidas por receptores de manosa, DEC205, integrinas y receptores scavenger), o bien moléculas unidas a la partícula, como ocurre con algunas opsoninas, como fragmentos de componentes del complemento (C3b) o inmunoglobulinas (reconocidas por FcγRs) (Aderem A. *et al.* 1999).

El proceso de fagocitosis mediada a través de FcγR ha sido descrito por el modelo del “cierre” (zipper). Este modelo describe un proceso guiado por interacciones secuenciales entre ligandos y sus receptores. Tras el primer contacto del receptor del fagocito con su ligando en la superficie de la partícula a internalizar, se desencadena una señal intracelular que conducirá al rearrreglo del citoesqueleto induciendo la extensión de la membrana del fagocito sobre la partícula. Conforme se extiende la membrana se alcanzará a otro ligando sobre la partícula a internalizar y se iniciará otra señal similar a la primera. De este modo, mientras se avanza sobre la partícula se establecen interacciones ligando-receptor que guiarán la extensión de la membrana hasta que la partícula es rodeada por completo, la copa fagocítica se cierra y la partícula es internalizada (Fig 2). Este proceso involucra, además de los receptores mediante los cuales se induce la extensión de la membrana, polimerización de actina (requerida para la formación de pseudópodos), diferentes clases de miosina (que proveen de la fuerza motora que media el avance de la membrana), y cuando la partícula a internalizar es muy grande, se requiere de exocitosis de membrana (Swanson J. A. 2008).

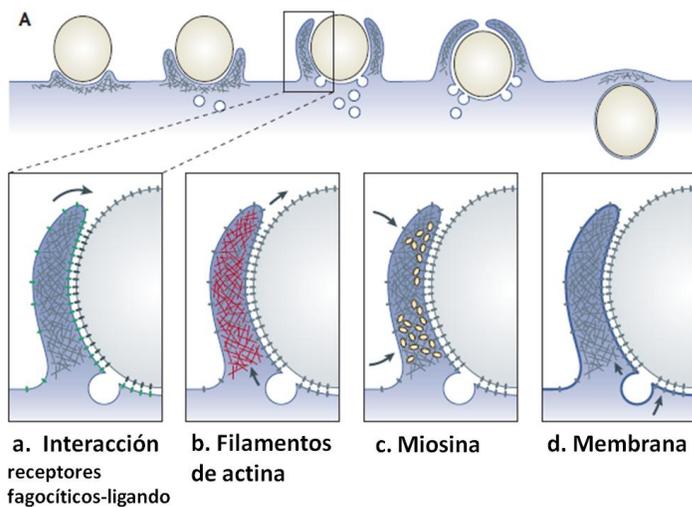


FIGURA 2. Modelo del cierre. Durante la fagocitosis mediada por FcγRs la membrana plasmática se despliega sobre la partícula a internalizar formando extensiones en forma de copa. El avance de la membrana es guiado por interacciones progresivas de FcγR (puntos verdes)-IgG unida a la partícula (Aa). Los filamentos de actina (rojo) y miosina (amarillo) que proveen de la fuerza contráctil se concentran en la copa fagocítica (Ab y Ac) mientras que membrana proveniente de compartimentos intracelulares se inserta en la base de la copa en formación (Ad). Tomado de (Swanson J. A. 2008).

2. Receptores para la región Fc de inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas juegan un papel muy importante en los mecanismos de defensa del organismo. Son producidas por linfocitos B, que pueden expresarlas en su membrana para que cumplan la función de receptores para antígeno, o bien secretarlas 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 la membrana, que son específicos para el segmento Fc de la inmunoglobulina (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, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), entre otras.

Se han descrito receptores específicos para las regiones Fc de cada una de las distintas clases de inmunoglobulinas (Fc α R, Fc δ R, Fc ϵ R, Fc γ R y Fc μ R). Estas moléculas se pueden encontrar tanto como receptores de membrana, así como en forma de moléculas solubles, producidos por splicing alternativo o por proteólisis de receptores de membrana (Daeron M. 1997). Los receptores para la porción Fc de la IgG, IgA e IgE (el Fc ϵ RI, porque el Fc ϵ RII es miembro de la familia de las lectinas), son miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (Daeron M. 1997; Van Vugt Martine J *et al.* 2001; Boross Peter *et al.* 2008). 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).

Los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas unen la respuesta inmune humoral a la celular (Van Vugt Martine J *et al.* 2001), ya que cuando los FcR se unen al anticuerpo, que a su vez está unido por la porción Fab al antígeno, proveen a la célula de especificidad que algunas de ellas carecen para reconocer al antígeno e iniciar los mecanismos efectoras que conducirán a la eliminación del mismo.

Pueden distinguirse dos tipos generales de FcR: los que son expresados por leucocitos, que son específicos para cada tipo de inmunoglobulina y que activan funciones efectoras; y los que median el transporte de inmunoglobulinas a través de los epitelios o superficies endoteliales (Van Vugt Martine J *et al.* 2001; Boross Peter *et al.* 2008). Dentro de la familia de FcRs que median funciones efectoras los mejor caracterizados son el Fc ϵ RI y los Fc γ Rs. Los Fc γ Rs se dividen en dos grupos de acuerdo a si median activación o inhibición. Los Fc γ Rs activadores contienen en su región intracelular motivos de activación basados en tirosina o ITAMs, por sus siglas en inglés (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Los ITAMs son secuencias de aminoácidos esenciales para la activación de funciones biológicas, compuestos de un par de secuencias YXXL, separadas por siete residuos variables (Daeron M. 1997). Los FcRs inhibidores contienen motivos de regulación negativa, ya que en su región citoplásmica tienen motivos de inhibición basados en tirosina o ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif). Los ITIMs están compuestos por una secuencia de seis aminoácidos, IYXXL. En general el entrecruzamiento de los Fc γ Rs inicia diferentes funciones biológicas, de activación o de inhibición dependiendo del tipo de receptor entrecruzado (Van Vugt Martine J *et al.* 2001; Nimmerjahn F. *et al.* 2008). La respuesta biológica parece depender además

de la clase de receptor entrecruzado, de la avidéz por el ligando y del tipo celular que sea estimulado (Daeron M. 1997).

2.1. Receptores para inmunoglobulinas G

Los receptores para la porción Fc de la inmunoglobulina G (Fc γ R) son una familia de receptores de membrana expresados sobre la mayoría de las células hematopoyéticas.

Los Fc γ R están formados por las subunidades FcR α y FcR γ , exceptuando al Fc γ RII, que no tiene cadena γ y que en su cadena α contiene al ITAM (Fc γ RIIa) o ITIM (Fc γ RIIb). La subunidad FcR α es una molécula transmembranal que tiene dos o tres dominios extracelulares de inmunoglobulina de tipo variable y es la encargada de unir al ligando. La cadena FcR γ es una molécula transmembranal con una región extracelular corta y una porción citoplásmica que contiene el ITAM. Las cadenas FcR γ forman dímeros unidos por puentes disulfuro. La cadena FcR α y un dímero de cadenas FcR γ se asocian a través de interacciones no covalentes (Fig.3).

La afinidad de las diferentes clases de Fc γ R por la porción Fc de las IgG es distinta. El Fc γ RI es de alta afinidad ($K_a=10^8-10^9 M^{-1}$) por lo que es capaz de unir IgG monomérica. En cambio el resto de los Fc γ Rs son de baja afinidad ($K_a<10^7 M^{-1}$) por lo que sólo unen IgG cuando ésta se encuentra formando parte de complejos inmunes o antígenos opsonizados (Boross Peter et al. 2008).

Fc γ RI (CD64): Son los receptores con la afinidad más alta por IgG. Se expresan en la membrana como un complejo entre una cadena α que contiene el sitio de unión de la IgG, y un dímero de cadenas γ . El Fc γ RI se expresa constitutivamente en células dendríticas, monocitos y macrófagos, y es inducible en neutrófilos y eosinófilos. Tiene una región extracelular que contiene tres dominios homólogos a dominios de inmunoglobulinas (Daeron M. 1997; Li X. et al. 2009). El tercer dominio extracelular es característica particular del Fc γ RI, ya que los Fc γ RII y III sólo tienen dos dominios extracelulares. A este tercer dominio se le ha atribuido la alta afinidad del Fc γ RI por la porción Fc de la IgG.

Existen tres genes, que codifican para los Fc γ RI: A, B y C. El Fc γ RIa; es la única isoforma cuya expresión en la membrana celular se ha demostrado. El Fc γ RIc codifica para una proteína similar al Fc γ RIb, pero soluble y de baja afinidad (Ernst L. K. et al. 1993; Li X. et al. 2009). Las cadenas FcR γ son esenciales para la expresión del Fc γ RIa en la membrana celular (podría expresarse en ausencia de las cadenas γ aunque de manera transitoria) (Li X. et al. 2009), y son indispensables para la transducción de señales a través de este receptor (Daeron M. 1997).

Fc γ RII (CD32): Son un grupo de receptores con baja afinidad por IgG expresados en todas las células hematopoyéticas que tienen Fc γ Rs, con excepción de las células NK. La familia del Fc γ RII comprende 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) (Daeron M. 1997). Todas las proteínas son muy similares, la mayor heterogeneidad entre ellas está en sus dominios citoplásmicos. Los Fc γ RII tienen en su porción extracelular dos dominios de inmunoglobulina. En la región citoplásmica contienen los dominios necesarios para señalar, por lo que no requieren de la asociación con cadenas γ o ζ (Daeron M. 1997; Li X. et al. 2009).

Los Fc γ RIIa y Fc γ RIIc inducen señales de activación de respuestas celulares en monocitos, macrófagos y neutrófilos (Fig 3) mientras que el Fc γ RIIB participa en la regulación negativa de estas señales, ya que en lugar de ITAM contiene ITIM. Además, el Fc γ RIIB regula negativamente la activación de células B mediada por el BCR y es capaz de regular negativamente la activación de funciones efectoras por distintos receptores para inmunoglobulinas, como los receptores para IgA, 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 fosfatasas de tirosina y de lípidos (Daeron M. 1997; Nimmerjahn F. et al. 2008; Li X. et al. 2009).

Fc γ RIII (CD16): Este receptor es codificado por dos genes diferentes, A y B. Los productos de ambos genes codifican para proteínas con dominios extracelulares con dos dominios de inmunoglobulinas (Li X. et al. 2009). El gen Fc γ RIIIA codifica para un receptor transmembranal, 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 cadenas γ , un dímero de cadenas ζ o heterodímeros de cadenas γ - ζ (Masuda M. et al. 1993). Estas cadenas asociadas son requeridas para la expresión del Fc γ RIIIa, y son esenciales para la transducción de señales a través de este receptor. El gen Fc γ RIIIb codifica para moléculas de superficie celular que carecen de dominio transmembranal (Li X. et al. 2009) El Fc γ RIIIb se mantiene unido a la membrana por medio de un glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Fig 3), expresado 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.

Fc γ RIV: Recientemente descrito en ratón, el receptor Fc γ RIV (cuya caracterización es incompleta), también llamado CD16-2, muestra 63% de identidad en la secuencia de la porción extracelular con la del Fc γ RIIIA (CD16) humano. Existe evidencia de que requiere de la asociación con dímeros de la cadena Fc γ para expresarse en la superficie celular. La expresión de este receptor ha sido detectada en células del linaje mieloide (como monocitos de sangre periférica, células dendríticas de bazo y médula ósea, neutrófilos y macrófagos reclutados por tioglicolato) pero no ha sido detectada en poblaciones linfoides (ni en células T, ni B, ni en NKs) ni en otros granulocitos (Nimmerjahn F. et al. 2005).

A través de ensayos empleando moléculas de ratón se determinó que el FcγRIV se une a la IgG2a e IgG2b, con una afinidad intermedia entre el FcγRI, de alta afinidad, y los FcγRII y FcγRIII, de baja afinidad, con una $K_a = 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, pero no se une a la IgG1 o IgG3 en cantidad detectable (Nimmerjahn F. et al. 2005).

Las diferentes isoformas de FcγRs tienen distintas afinidades por las diferentes clases de IgG. Las afinidades relativas de interacción de los FcγR humanos con las distintas clases de IgG humanas son: para el FcγRI $\text{IgG1}=\text{IgG3}>\text{IgG4}>>\text{IgG2}$; FcγRII $\text{IgG3}\geq\text{IgG1}>>\text{IgG4}>\text{IgG2}$ y para FcγRIII $\text{IgG1}=\text{IgG3}>>\text{IgG2}>\text{IgG4}$ (Li X. et al. 2009).

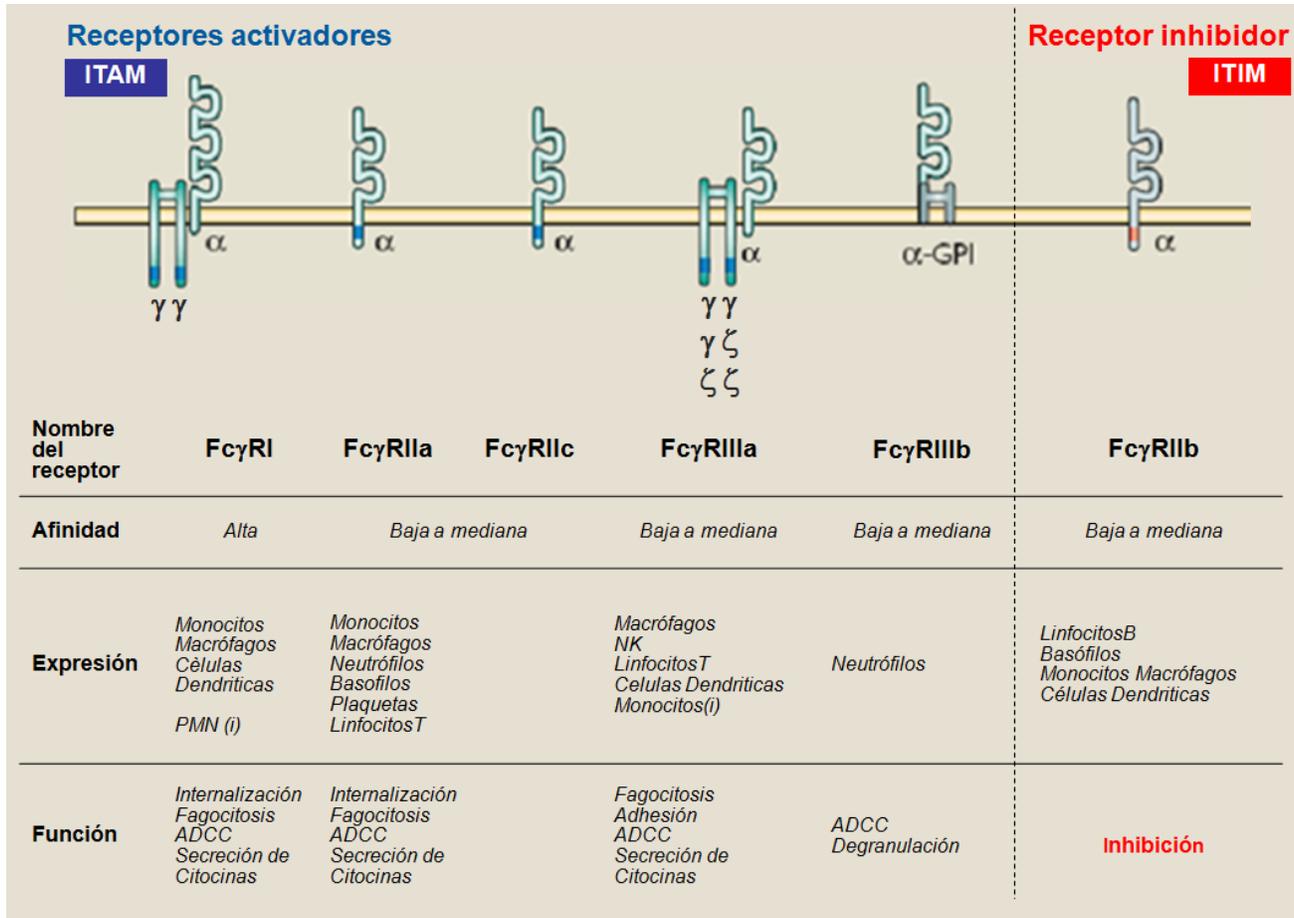


Figura 3. Estructura esquemática de los FcγRs. Las tirosinas del ITAM contenidas en las porciones citoplasmáticas están indicadas en rojo, los ITIM en azul. Se presentan los dominios extracelulares de unión al ligando en óvalos semicerrados. Todas las clases del receptor tienen un dominio transmembranaral y un tallo citoplasmático con excepción del FcγRIIIb el cual está unido a la membrana por glicofosfatidilinositol. El FcγRIIIa puede estar formado de la asociación de la cadena α y dos cadenas γ, la cadena α y dos cadenas ζ (que a diferencia de las cadenas γ tiene tres ITAMs) o la cadena α y un heterodímero γζ. Se presentan además las afinidades, las células que expresan cada isoforma y las funciones que desempeñan. (i) inducible. (Modificado de Nimmerjahn, F, et al. 2008)(Nimmerjahn F. et al. 2008).

3. Señalización a través de FcγRs

El primer evento intracelular que sigue a la agregación de los FcγRs activadores es la fosforilación de las tirosinas del ITAM, esta reacción está mediada por las cinasas de la familia Src (Daeron M. 1997). Una vez

fosforiladas las tirosinas del ITAM sirven de sitios de unión para enzimas que contienen dominios SH2, como la cinasa Syk. Activa por autofosforilación, Syk fosforila a otras enzimas activándolas. Entre sus substratos se encuentran: moléculas adaptadoras, PI3K, PLC γ , Btk, PLD, PLA2 y GEFs (factores intercambiadores de nucleótidos de guanina) (Nimmerjahn F. *et al.* 2008).

La PI3K activa cataliza la fosforilación de fosfolípidos de inositol de membrana. La reacción que lleva acabo es la adición de un grupo fosfato en la posición 3 del anillo de inositol, produciendo a partir de PI(4,5)P2 el PI(3,4,5)P3. El PIP3 servirá ahora de sitio de unión para enzimas que contienen dominios PH (dominios homólogos a plekstrina) como Btk, además se reclutan miosinas y a PLC γ .

Otra de las cinasas involucradas es Btk, que participa en la activación completa de PLC γ (Nimmerjahn F. 2006). Una vez activada, la fosfolipasa PLC γ hidroliza el PI(4,5)P2 a DAG e inositol trifosfato. El DAG producido activa a PKC ϵ , quien participa en la activación de PLA2 y en la activación de ERK. La cinasa ERK activa a su vez a proteínas de citoesqueleto (cuya identidad aún no se ha determinado) y a NF κ B que se transloca al núcleo para inducir la expresión de los genes de citocinas y de la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Por su parte, el IP3 se une a sus receptores en compartimientos intracelulares, como el retículo endoplásmico, induciendo la liberación de Ca²⁺, que junto con la entrada de Ca²⁺ del exterior del fagocito, aumenta la concentración de calcio en el citoplasma de la célula. El aumento en la concentración de Ca²⁺ junto con la presencia de DAG, activan, entre otras enzimas a PKC α .

La fosfolipasa D (PLD), también activada por Syk, hidroliza fosfatidilcolina a ácido fosfatídico y colina; el ácido fosfatídico es convertido en DAG por la ácido fosfatídico fosfohidrolasa 1 (APP-1) favoreciendo la activación de PKC. La fosfolipasa PLA2 hidroliza también la fosfatidilcolina pero para formar ácido araquidónico (precursor de mediadores inflamatorios como prostaglandinas y leucotrienos). Se ha propuesto que el ácido araquidónico participa además en la fusión de membranas para la formación del fagosoma y se ha demostrado que junto con la PKC α activa a la NADPH oxidasa para la producción de especies reactivas de oxígeno en el fagosoma. Syk activa también a GEFs como Vav, DOC180 y Dbl. Estos intercambiadores activan a las pequeñas GTPasas Cdc42, Rho y Rac, induciendo el cambio conformacional necesario para que se intercambie GDP por GTP (Heasman S. J. *et al.* 2008). La conformación de las GTPasa activadas les confiere la capacidad de interactuar a Cdc42 con WASp y a Rac con WAVE (Cory G. O. *et al.* 2002; Heasman S. J. *et al.* 2008). Estas dos últimas forman un complejo con Arp2 y 3 que da inicio a la polimerización de actina que llevará a la formación de lamelipodia y filopodia. Recientemente se ha demostrado que los GEFs y WASP poseen varios sitios susceptibles de fosforilación que inducen la activación completa de estas enzimas. Prueba de ello es la actividad de la cinasa Hck (de la familia Src) que participa junto con Syk en la activación completa de GEFs como Vav, además de la capacidad de Hck de fosforilar a WASp induciendo su activación independiente de Cdc42 y PI(4,5)P2 (Cory G. O. *et al.* 2002).

La formación de copas fagocíticas de partículas mayores a 3 μ m requiere de exocitosis de membrana

proveniente del citosol (endosomas reciclados, endosomas tardíos y retículo endoplásmico). El flujo de membrana del interior de la célula, así como la fusión de membranas externa con interna requiere de la participación de PI3K (Cox D. *et al.* 1999) y las SNAREs que guiarán a las vesículas a fusionarse en el sitio donde se está llevando a cabo la formación de la copa fagocítica (Groves E. *et al.* 2008).

La señalización a través de FcγRs está sujeta a regulación homóloga. En este caso la regulación negativa está mediada por la isoforma FcγRIIb, que como mencionó antes, en lugar de motivos de activación basados en tirosina (ITAM), contiene motivos de inhibición (ITIM). De manera que si el agregado contiene receptores activadores y el receptor inhibidor FcγRIIb, al ser fosforilado por acción de la cinasa de la familia Src, Fgr, el ITIM reclutará fosfatasa. Este evento genera los sitios de unión para la proteína tirosina fosfatasa que contiene dominios SH2 (SHP-1), una de las fosfatasa reclutadas. SHP-1 activada tiene la capacidad de desfosforilar a los ITAMs, a Syk, y a la subunidad p85 de PI3K (Daeron M. *et al.* 2006). Esta desfosforilación interrumpe la señal iniciada por la agregación de receptores activadores. Además de fosfatasa de tirosinas se recluta a SHIP, una fosfatasa de fosfolípidos de inositol, cuya función es remover el grupo fosfato de la posición 5 del anillo de inositol de inosoles fosforilados y de fosfatidil inosítidos. Tomando como sustrato al PI(3,4,5)P3 (generado por la PI3K), SHIP produce PI(3,4)P2 (Daeron M. *et al.* 2006). Sin PI(3,4,5)P3 no se reclutará ninguna de las proteínas con dominios de homología a pleckstrina (dominios PH) como PLCγ, Btk, Akt, Vav, (Sly L. M. *et al.* 2007; Nimmerjahn F. *et al.* 2008), y de esta manera, la co-agregación del FcγRIIb con FcγR activadores induce la regulación negativa de la señal iniciada por la agregación de receptores activadores.

Este trabajo se enfocó en la evaluación de algunos eventos de señalización dada su importancia en el proceso fagocítico, por lo cual su trascendencia se detalla en los siguientes párrafos.

La actividad de la cinasa de tirosina **Syk** es indispensable para la señalización mediada por FcγR (Sada K. *et al.* 2001). Ensayos realizados en macrófagos murinos *syk*^{-/-} demuestran que, a pesar de tener intacta la capacidad de unir eritrocitos opsonizados con IgG, estos macrófagos son incapaces de completar la internalización de la partícula. Otros eventos intracelulares imprescindibles para la fagocitosis como lo es la activación de **PI3K** (Cox D. *et al.* 1999) también se encuentran afectados tras la ausencia de Syk (Crowley M. T. *et al.* 1997), por lo que Syk, siendo una de las enzimas iniciales en la casca tiene un papel clave en el proceso fagocítico.

El papel crítico de PI3K en la fagocitosis ha sido descrito en varios modelos usando inhibidores como Wortmanina y LY294002 (Cox D. *et al.* 1999). En presencia de inhibidores de PI3K la acumulación de F-actina inducida tras el entrecruzamiento de FcγR y necesaria para la fagocitosis de partículas opsonizadas es normal, mientras que la extensión de los pseudópodos es deficiente y la exocitosis de membrana requerida para internalizar partículas de entre 4.5 y 6 μm de diámetro se reduce a menos de la mitad; por lo que la fagocitosis llega a ser nula dependiendo de la concentración de inhibidor. Lo que muestra que la actividad de

PI3K es imprescindible para el proceso fagocítico (aunque no lo sea para la endocitosis) (Cox D. *et al.* 1999). Los productos de PI3K son los sitios de unión para muchas de las enzimas involucradas en el reareglo del citoesqueleto, es por ello que en ausencia de la actividad de PI3K los complejos enzimáticos necesarios para la formación del fagosoma no se reclutan al sitio de la célula donde está ocurriendo la interacción de la partícula opsonizada-FcγR.

Aunque el **incremento en el $[Ca^{2*}]_i$** es un evento temprano que acompaña la fagocitosis, la internalización de las partículas es independiente de él (Nunes P. *et al.* 2010). El incremento de $[Ca^{2*}]_i$ no se requiere para la fagocitosis a través de FcγRs (Di Virgilio F. *et al.* 1988); (Larsen E. C. *et al.* 2000). Al parecer la elevación de $[Ca^{2*}]_i$ regula pasos posteriores al proceso fagocítico, y es requerida para la eficiente maduración del fagosoma (Nunes P. *et al.* 2010), pero no para la fagocitosis. A pesar de no ser indispensable para la internalización de partículas, el incremento de $[Ca^{2*}]_i$ es parte de la vía de señalización que además se encuentra río abajo de la actividad de PI3K. Por ello la evaluación de flujo de calcio se convierte en un indicador del estado de la señal río arriba.

Como ya se ha mencionado antes la formación de filamentos de actina (**F-actina**) es necesaria para el proceso fagocítico. Ensayos utilizando citocalasina B, que impide la polimerización de actina ya que bloquea la adición de G-actina a los filamentos en formación, muestran que la producción de F-actina es imprescindible para la fagocitosis (Axline S. G. *et al.* 1974). Los filamentos de actina se producen a partir de actina monomérica o globular (G-actina). La G-actina es una proteína globular que contiene nucleótidos, ya sea ATP o GTP. El crecimiento de filamento de actina está orientado hacia la membrana plasmática. La elongación de los filamentos de actina empuja a la membrana hacia adelante induciendo la formación de protrusiones de la membrana plasmática. La polimerización de actina es iniciado tras la activación de proteínas de la familia WASP/WAVE/Scar en la membrana plasmática. Estas proteínas inducen la formación del complejo de proteínas relacionadas con actina 2/3 (actin-related protein, APR) que promueven la nucleación de actina en los sitios de ramificación. El bloqueo de la elongación en el extremo ramificado (extremo +) de los filamentos permite mantener las longitudes óptimas de los filamentos para la eficiente fuerza motora. El envejecimiento de los filamentos de actina es acompañado por la hidrólisis de ATP para generar actina-ADP, lo que ocurre hacia los extremos en punta (extremo -). Los filamentos de actina-ADP son menos estables por lo que en estas zonas se favorece la despolimerización y ruptura mediada por proteínas de la familia de la cofilina. Los monómeros de actina liberados del filamento de los extremos (-) son capturados por proteínas que secuestran los monómeros o pueden interactuar con profilina, que “recarga” a los monómeros con ATP para generar monómeros de actina-ATP disponibles para una nueva ronda de polimerización. En conjunto los filamentos de actina y los filamentos de miosina forman estructuras contráctiles que

darán la fuerza motora a la membrana de los fagocitos para que la internalización de una partícula se complete (Saarikangas J. *et al.* 2010).

La participación de las GTPasas pequeñas de la familia Rho en el rearrreglo del citoesqueleto de actina necesario para la motilidad celular y respuestas que involucran el rearrreglo del citoesqueleto es ampliamente reconocido (Heasman S. J. *et al.* 2008; Olson E. N. *et al.* 2010; Saarikangas J. *et al.* 2010). Una vez recibido el estímulo a través de receptores ubicados en la membrana celular, las señales de activación para las GTPasa pequeñas serán inducidas por la activación de las GTPasas por distintos GEFs. La familia de GTPasas Rho comprende varias subfamilias de las que Rho, **Rac** y **Cdc42** son miembros. Estas GTPasas regulan la actividad de proteínas efectoras que modulan el equilibrio de polimerización entre la G-actina y la F-actina en el citoplasma, incluyendo factores de inducen nucleación de actina como la profilina y ARP 2/3 (Olson E. N. *et al.* 2010). Dado que los knockout de Rac1 y Cdc42 son letales, el uso de dominantes negativas de GTPasas ha sido la herramienta para determinar los requerimientos de las diferentes GTPasas de acuerdo al receptor fagocítico (Heasman S. J. *et al.* 2008). Aunque se ha observado que las células dominante negativas para Rac1 y Cdc42 son capaces de formar copas fagocíticas, la extensión y el número de fagosomas es de apenas la tercera parte comparado con células control. La fagocitosis mediada por FcgRs no se completa en estas células, lo que correlaciona con las alteraciones en la dinámica de F-actina por la usencia de las formas activades de Cdc42 y Rac (Beemiller P. *et al.* 2010). Los resultados de los trabajos han mostrado que las GTPasas Cdc42 y Rac son requeridas para la fagocitosis mediada por FcγRs y de cálulas apoptóticas, mientras que Rho es necesaria para la fagocitosis a través de complemento (Heasman S. J. *et al.* 2008). El análisis de las cinéticas de activación de Rac1, Rac2 y Cdc42 indica que cada una de ellas participa en diferentes etapas durante el proceso fagocítico. Se sabe que Rac1 y Cdc42 regulan la polimerización de actina para la formación de lamelipodia y filopodia, respectivamente. Por otro lado, la isoforma Rac2, a diferencia de Rac1 y Cdc42, se activa en la base de la copa fagocítica donde la F-actina está siendo depletada durante la fagocitosis. Rac2 además es requerida para la liberación de gránulos y la activación de la NADPH oxidasa, mientras que la participación de Rac1 en esta parte del proceso es mínima (Heasman S. J. *et al.* 2008).

La figura 4 muestra de manera esquemática las vías de señalización mediadas por FcγR.



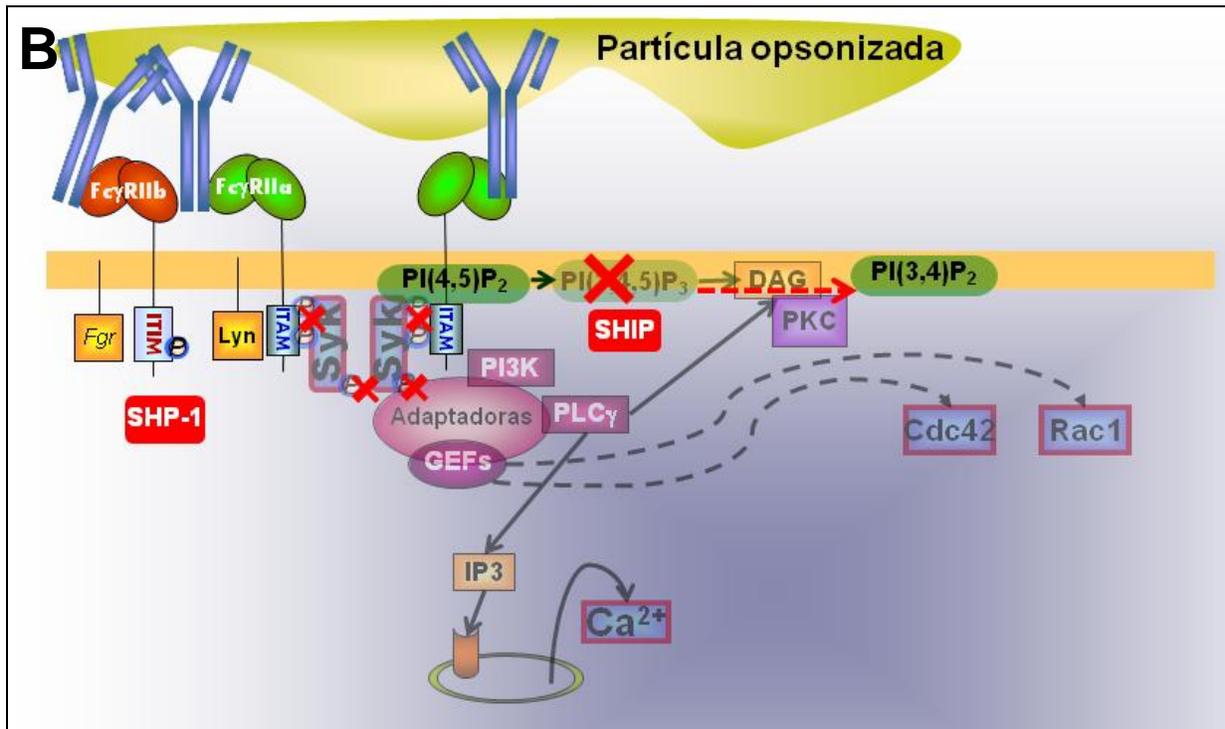
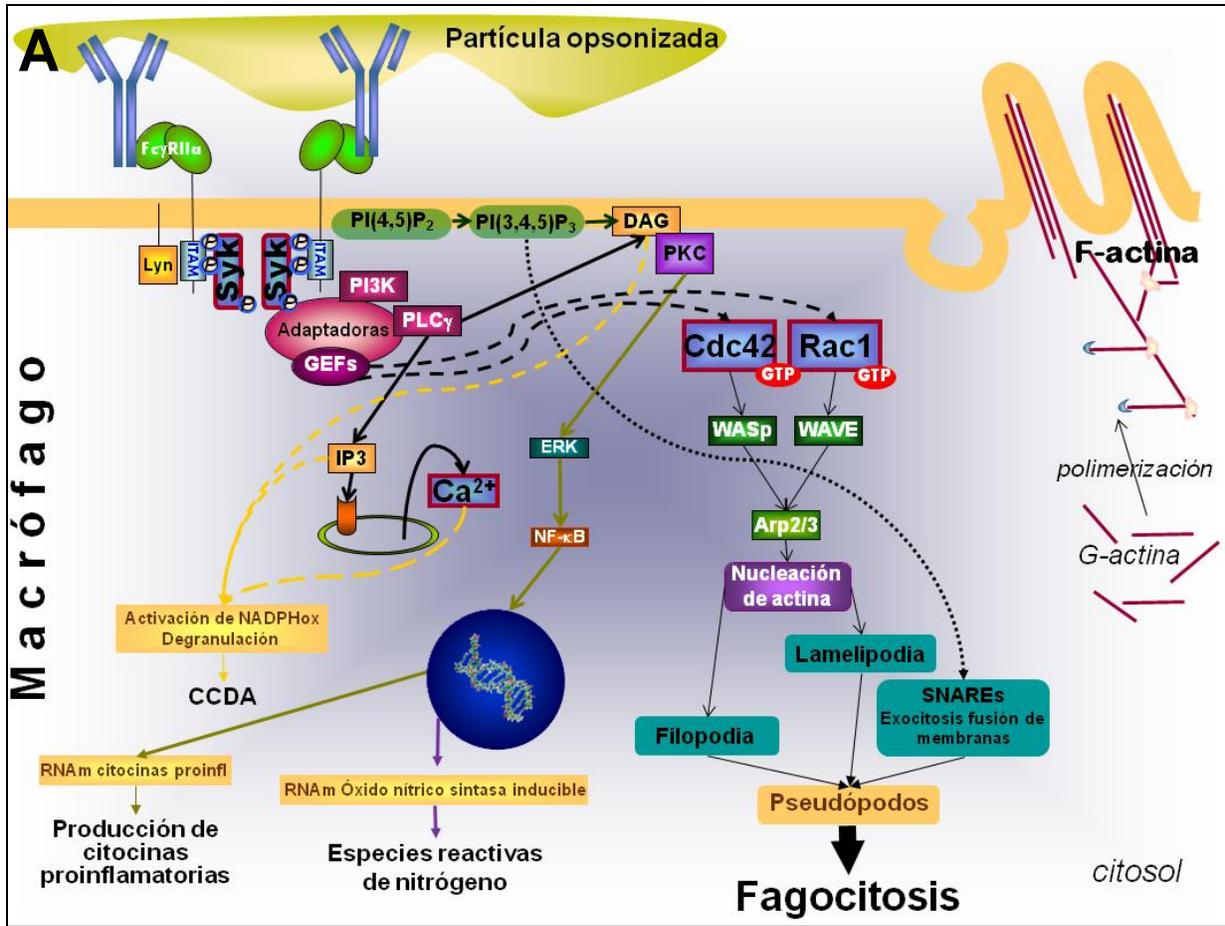


Figura 4. Señalización a través de FcγR. A. En el esquema se muestra el entrecruzamiento de FcγRIIa, uno de los FcγRs que contienen ITAM. Tras la unión del FcγRIIa a una partícula opsonizada con IgG, las tirosinas de los ITAM son fosforiladas por la cinasa Lyn (Daeron M. 1997). Las tirosinas fosforiladas del ITAM son los sitios de unión para la cinasa Syk, que una vez activada por autofosforilación, fosforila a otras enzimas activándolas también. Los sustratos de Syk incluyen moléculas adaptadoras, PI3K, PLCγ, PLD, PLA2 (no mostrados en la figura 5) y GEFs (factores intercambiadores de nucleótidos de guanina) (Nimmerjahn F. *et al.* 2008). La PI3K cataliza la fosforilación del PI(4,5)P2 a PI(3,4,5)P3. El PIP3 servirá de sitio de unión para enzimas que contienen dominios PH. Una vez activada, la fosfolipasa PLCγ hidroliza el PI(4,5)P2 a DAG e inositol trifosfato. El DAG activa a PKCε, quien participa en la activación de PLA2 (no mostrado en el esquema) y en la activación de ERK, quien activa a su vez a proteínas de citoesqueleto (cuya identidad aún no se ha determinado) ya a NFκB que se transloca al núcleo para inducir la expresión de los genes de citocinas y de la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Por su parte, el IP3 se une a sus receptores en compartimientos intracelulares, como el retículo endoplásmico, induciendo la liberación de $[Ca^{2+}]_i$, que junto con la entrada de Ca^{2+} del exterior del fagocito, aumenta la concentración de calcio en el citoplasma de la célula. El aumento en la concentración de Ca^{2+} junto con la presencia de DAG, activan, entre otras enzimas como PKCα. Syk activa también a GEFs como Vav, DOC180 y Dbl. Estos intercambiadores activan a las GTPasas pequeñas Rac1 y Cdc42, induciendo el cambio conformacional necesario para que se intercambie GDP por GTP (Heasman S. J. *et al.* 2008). La conformación de las GTPasa activadas les confiere la capacidad de interactuar a Cdc42 con WASp y a Rac con WAVE (Cory G. O. *et al.* 2002; Heasman S. J. *et al.* 2008). Estas dos últimas forman un complejo con Arp2/3 que da inicio a la polimerización de actina que llevará a la formación de lamelipodia y filopodia. La formación de copas fagocíticas de partículas mayores a 3μm requiere de exocitosis de membrana proveniente del citosol (endosomas reciclados, endosomas tardíos y retículo endoplásmico). El flujo de membrana del interior de la célula, así como la fusión de membranas externa con interna requiere de la participación de PI3K (Cox D. *et al.* 1997) y las SNAREs que guiarán a las vesículas a fusionarse en el sitio donde se está llevando a cabo la formación de la copa fagocítica (Groves E. *et al.* 2008). **B.** Todo lo anterior ocurre cuando se agregan receptores que contienen ITAM, pero si en el agregado se coagrega el receptor FcγRIIb, que en lugar de ITAM contiene un ITIM, al fosforilarse su ITIM, a través de Fgr (cinasa de la familia Src) se reclutarán fosfatasas en lugar de cinasas. SHP-1 y SHIP son las dos fosfatasas reclutadas. SHP-1 tiene como sustratos a los grupos fosfato de ITAMs, de Syk y de PI3K (Daeron M. *et al.* 2006). Por otro lado SHIP1, una fosfatasa de fosfolípidos de inositol, remueve el grupo fosfato del anillo de inositol de PI(3,4,5)P3 (generado por la PI3K), produciendo PI(3,4)P2 (Daeron M. *et al.* 2006). Además de la desfosforilación de los ITAMs así como de otras proteínas fosforiladas en tirosina, la disminución de PI(3,4,5)P3 impedirá que se recluten de manera eficiente las proteínas con dominios PH como PLCγ, Btk, Akt y Vav,. La actividad de estas fosfatasas interrumpe la señal iniciada por la agregación de receptores activadores (Sly L. M. *et al.* 2007; Nimmerjahn F. *et al.* 2008). De esta manera, la coagregación del FcγRIIb con FcγR activadores induce la regulación negativa de la señal iniciada por la agregación de receptores activadores. Tratando de simplificar el esquema no se incluyeron la participación de PLD ni PLA, que llevan a la producción de mediadores proinflamatorios (prostaglandinas y leucotrienos) así mismo no se incluyó el ensamblaje de la NADPH oxidasa para la producción de especies reactivas de oxígeno que median las GTPasas Ras y Rho, aún cuando son señales importantes también mediadas por FcγRs. Esquemas armados por información encontrada en las citas mencionadas en este pie de figura.

Interleucina-10 (IL-10): expresión, receptor, vía de señalización y actividad biológica en macrófagos.

La interleucina-10 (IL-10) fue descrita en 1989 por Mosmann y colaboradores como un mediador inmune secretado por linfocitos cooperadores tipo Th 2 murinos que es capaz de inhibir la síntesis de IL-2 e IFN γ en linfocitos Th1. Originalmente fue llamado factor inhibidor de la síntesis de citocinas o CSIF (por sus siglas en inglés), y hoy se conoce como IL-10 (Sabat R. et al. 2010). La IL-10 murina (mIL-10) tiene un 75 % de homología con la IL-10 humana (hIL-10). La hIL-10 es activa en ratones y humanos, mientras que la mIL-10 sólo es activa en ratones. La IL-10 humana recombinante (rhIL-10) es un polipéptido de 17-18 kDa no glicosilado. Análisis bioquímicos y cristalográficos demuestran que la hIL-10 es un homodímero de cadenas polipeptídicas de 35 kDa unidas no covalentemente. IL-10 no sólo es expresada por células T, sino por casi todos los leucocitos. Las principales fuentes *in vivo* son monocitos y macrófagos así como células Th, además de células dendríticas, linfocitos B, células T citotóxicas, linfocitos T $\gamma\delta$, células NK, células cebadas, neutrófilos y eosinófilos (Moore K. W. et al. 2001; Sabat R. 2010; Sabat R. et al. 2010). Aunque en todas estas células IL-10 es expresada en respuesta a un estímulo de activación, el tipo de estímulo y del tejido afectado, así como el punto en el que se encuentra la respuesta inmune definirán qué tipo celular produzca IL-10 y la cantidad producida. En monocitos y macrófagos se secreta IL-10 en respuesta a LPS y catecolaminas, así como durante la remoción de células apoptóticas. En linfocitos Th1 la producción de IL-10 es inducida tras la activación del TCR, y es incrementada por IL-12 e IL-27 (Moore K. W. et al. 2001; Sabat R. et al. 2010). Algunos estímulos son capaces de inducir la secreción de IL-10 e IFN γ , incluso por el mismo tipo celular.

Las actividades pleiotrópicas de IL-10 son mediadas por su receptor. El IL-10R está compuesto por dos subunidades IL-10R1 e IL-10R2. La subunidad IL-10R1 (IL-10R α), subunidad de unión al ligando, es expresada en la mayoría de las células hematopoyéticas, aunque a muy bajos niveles (de 100 a 800 moléculas por célula). El estado de activación de los monocitos, que son quienes exhiben el más alto nivel de expresión de IL-10R, está asociado con la regulación positiva de la expresión de IL-10R1. Aunque se conocen muy pocos reguladores de la expresión de IL-10R en macrófagos, se sabe que el LPS aumenta muy levemente la expresión de IL-10R en monocitos y macrófagos. La subunidad IL-10R1 no es expresada de manera constitutiva en células no hematopoyéticas, aunque la expresión de IL-10R puede inducirse en algunos epitelios como el del colon.

La subunidad IL-10R2 (IL-10R β), la subunidad accesoria, es expresada en mayores niveles y más ampliamente (en la mayoría de las células y tejidos) que IL-10R1. Mientras que la subunidad IL-10R1 es específica para la formación del complejo IL-10R, IL-10R2 es simultáneamente parte del complejo receptor de otras citocinas (IL-22, IL-26, IL-28 e IL-29). IL-10R2 sola es incapaz de unir IL-10, al parecer su función es el reclutamiento de la Jak cinasa Tyk2 al complejo de señalización. (Moore K. W. et al. 2001; Sabat R. et al. 2010).

4.1 Señalización

La unión de IL-10 a su receptor ocurre en dos pasos: la unión de IL-10 a IL-10R1, lo que genera un cambio conformacional de IL-10/IL-10R1 que permite que ocurra el segundo paso, la unión de IL-10R2 con el complejo IL-10/IL-10R1. La vía de señalización inducida por IL-10 mejor caracterizada es la vía que usa a proteínas Jak/Stat. La unión de IL-10 a su receptor activa a Tyk2 y Jak1, dos miembros de la familia de las cinasas de Janus. Estas cinasas fosforilan a las tirosinas 446 y 496 de IL-10R1, lo cual genera el sitio de unión para el factor de transcripción Stat3. Además de Stat3, en ciertos tipos celulares se recluta a Stat1 y Stat5. Una vez fosforilados, los mencionados factores de transcripción forman homo y heterodímeros que migran al núcleo celular y se unen a elementos promotores en el DNA para inducir la transcripción de los genes correspondientes.

4.2 Actividad biológica

El efecto biológico de IL-10 es muy variado entre las poblaciones celulares afectadas que incluyen timocitos, células T, B, NK, células cebadas, neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos. De entre todo este grupo de células se sabe que el blanco principal de la IL-10 son las células monocíticas (Sabat R. 2010), y que los efectos en macrófagos humanos son similares a aquellos observados en monocitos, aunque menos pronunciados. En células monocíticas, IL-10 inhibe la secreción inducida por LPS e IFN γ de IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF y TNF α (Sabat R. et al. 2010). En monocitos/macrófagos activados, IL-10 inhibe además la producción de IL-1 α , IL-10, IL-12 e IL-18. La IL-10 inhibe también la producción de quimiocinas implicadas en el reclutamiento de monocitos, células dendríticas, neutrófilos y linfocitos T (MCP1, MCP-5, Mip-1 α , Mip-1 β , Mip-3 β , CCL5, MDC, IL-8, IP-10 y MIP-2). Contrario al efecto inhibitorio sobre la producción de quimiocinas, IL-10 regula positivamente la expresión de algunos de los receptores de quimiocinas, entre ellos CCR1, CCR2 y CCR5, lo cual induce el aumento en la respuesta ante MCP-1 y Mip-

1 β (reconocidos a través de CCR2 y CCR5, respectivamente) (Sozzani S. et al. 1998). IL-10 inhibe la presentación de antígeno disminuyendo la expresión de moléculas del MHC clase II y coestimuladoras (CD54 (ICAM-1), CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2), aún después de haber sido inducidas por IL-4 o IFN γ (Moore K. W. et al. 2001). IL-10 aumenta la expresión de CD64 (Fc γ RI), CD32 (Fc γ RII) y CD16 (Fc γ RIII), (te Velde A. A. et al. 1992; Capsoni F. et al. 1995; Spittler A. et al. 1995; Moore K. W. et al. 2001; Liu Y. et al. 2005; Leidi M. et al. 2009; Sabat R. et al. 2010), y regula negativamente la expresión de CD23 (Fc ϵ RII) inducida por IL-4 (Morinobu A. et al. 1996). La regulación positiva de la expresión de los Fc γ R inducida por IL-10 correlaciona con el aumento en la capacidad fagocítica de partículas opsonizadas con IgG en monocitos y macrófagos humanos, como son bacterias (Spittler A. et al. 1995; Buchwald U. K. et al. 1999; Lingnau M. et al. 2007), partículas de látex (Spittler A. et al. 1995), eritrocitos de carnero (Capsoni F. et al. 1995; Liu Y. et al. 2005), células B (Leidi M. et al. 2009) y células apoptóticas (Lingnau M. et al. 2007).

5. IFN γ : proteína, expresión, receptor, vías de señalización y actividad biológica en macrófagos.

En 1957, Issacs y Lindenmann descubrieron una sustancia cuya actividad *in vitro* interfería con la capacidad del virus de la influenza A de infectar células, por lo que la llamaron interferón (Isaacs A. et al. 1957). Posteriormente se determinó que en realidad se trata de una familia de proteínas cuya característica principal es la actividad antiviral de amplio espectro (Johnson H. M. et al. 2005). El IFN- γ es un homodímero de 32 kDa que pertenece a la familia de interferones la cual incluye interferones del tipo I (α , β , ω y τ), los del tipo II (del cual IFN γ es el único integrante) y el tipo III (λ). El IFN γ es secretado por células del sistema inmune activadas, Th1, TCD8⁺ y NK, principalmente, y por células B, NKT y células presentadoras de antígeno profesionales (APCs), en menor cantidad (Boehm U. et al. 1997; Gough D. J. et al. 2008; Savan R. et al. 2009). El principal inductor de la producción de IFN γ en células T es el entrecruzamiento del TCR. En células NK la producción de IFN γ es estimulada por citocinas derivadas de macrófagos y células dendríticas, especialmente TNF α e IL-12, y por el mismo IFN γ (Boehm U. et al. 1997). Además de ser inducido tras infecciones virales, el IFN γ también se produce por infecciones bacterianas. La presencia de moléculas como dsRNA, motivos CpG, LPS presente en bacterias Gram negativas, y otros ligandos de TLRs inducen la producción de IFN γ (Billiau A. 2006).

La actividad del IFN γ depende de la unión al complejo del receptor compuesto por las subunidades IFN- γ R1 e IFN- γ R2 (Savan R. et al. 2009). La ausencia de IFN γ o de su receptor se

asocia con el aumento en la susceptibilidad a infecciones bacterianas y virales en ratón. En humanos, la deficiencia completa de IFN γ R es asociada con frecuentes infecciones e incluso la muerte ocasionada por micobacterias poco virulentas como el bacilo de Calmette-Guerin. Los pacientes con deficiencia parcial de IFN γ R padecen de efectos similares pero con manifestación más leve. La incapacidad de secretar IFN γ o el desarrollo de auto-anticuerpos neutralizantes endógenos anti-IFN γ tienen como resultado la muerte de los pacientes causada por una exacerbada infección por micobacterias. Además de participar en la eliminación de patógenos, el IFN γ es clave en la vigilancia inmunológica contra la aparición de tumores (Gough D. J. et al. 2008). Aunque el IFN γ es necesario para la eliminación de muchos tipos de infecciones, el exceso de IFN γ ha sido asociado con patologías autoinmunes e inflamatorias crónicas como son la esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del bazo y diabetes mellitus (Schoenborn J. R. *et al.* 2007).

5.1 Señalización

5.1.1 Señalización canónica

La vía convencional de señalización inducida por IFN γ se inicia con la unión del IFN γ a las subunidades IFN γ R1 y IFN γ R2, lo que genera la oligomerización de ambas subunidades. Jak1 y Jak2, que se encuentran asociados constitutivamente con las cadenas IFN γ R1 e IFN γ R2 respectivamente, se fosforilan una a otra tras la oligomerización del receptor. La tirosina 440 del IFN γ R1 fosforilada (probablemente por acción de Jak2) es el sitio de unión para el dominio SH2 del factor de transcripción Stat1. Una vez reclutado, Stat1 es fosforilado en Y701 lo que permite que se forme y disocie del receptor el homodímero de Stat1. La fosforilación de Stat1 en S727 es necesaria para que el homodímero de Stat1 se transloque al núcleo y se una al DNA en la región promotora de las secuencias activadas por IFN γ (gamma activated sequence, GAS). La importancia de la vía Jak/Stat1 en la actividad biológica del IFN γ es claramente evidente ya que deficiencias en las respuestas inmunológicas anti-virales, anti-micobacterianas y anti-tumorales observadas en ratones que carecen de Stat1 se asemejan en gran medida a ratones knockout para IFN γ o para IFN γ R (Gough D. J. et al. 2008). Sin embargo, aún en ausencia de la señalización a través de la vía Jak/Stat1 ocurren algunos eventos celulares tras la estimulación con IFN γ . Aproximadamente una tercera parte de los genes estimulados por IFN γ son aún regulados en ausencia de Stat1, sin que ocurran eventos de compensación por otras Stat (particularmente Stat3 y Stat5 que también son activadas por IFN γ). La figura 5 muestra un esquema de la señalización inducida por IFN γ .

5.1.2 Señalización alterna

Aunque se sabe poco de otras proteínas que además de las Jak/Stat sean reclutadas al IFN γ R después de la unión de IFN γ , y se ignora además si estas proteínas contribuyen a la señalización a través de Jak/Stat o inician vías de señalización alternas. Existe evidencia que demuestra la presencia de vías de señalización paralelas a las señales de Jak/Stat1 inducidas por IFN γ /IFN γ R (fig. 5) (Gough D. J. et al. 2008).

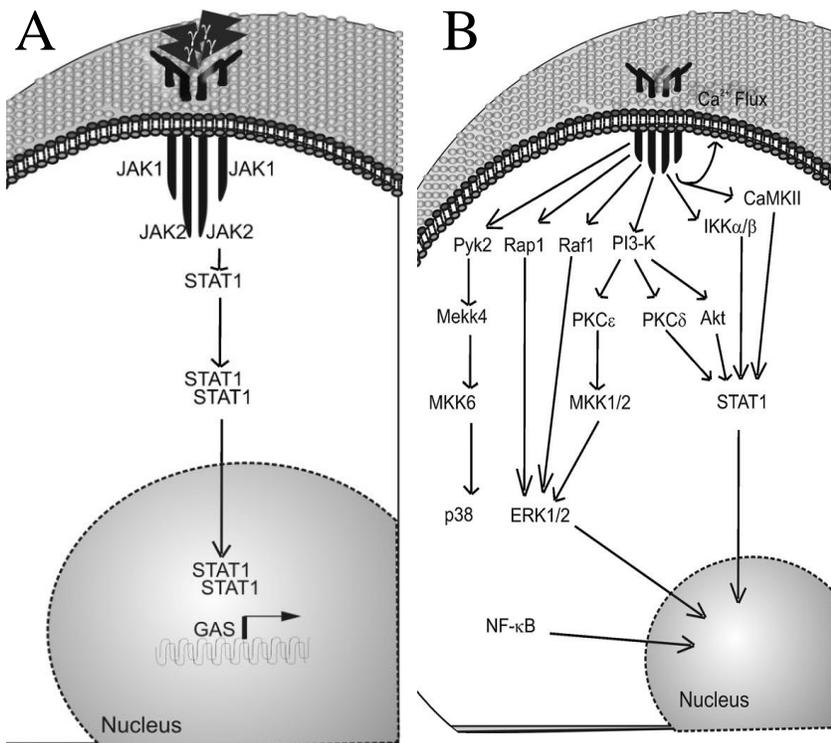


Figura 5. Señalización a través de IFN γ R. **A.** Vía de señalización canónica. La unión de IFN γ al receptor inicia la oligomerización de las subunidades del receptor. Con ellos se induce la transfosforilación de JAK 1 y 2 y del receptor. STAT1 se recluta al receptor donde se fosforila en tirosinas lo que permite la formación del homodímero de STAT1. El homodímero fosforilado de STAT1 se transloca al núcleo y se une a los elementos GAS para inducir la transcripción de los genes blanco. **B.** Otras moléculas activadas tras la unión de IFN γ a su receptor. Tomado de Gough D, *et al*, 2008.

A través de ensayos de co-inmunoprecipitación se han identificado algunas proteínas que interactúan con IFN γ R incluyendo cinasas de la familia Src, moléculas adaptadoras, factores intercambiadores de guanina (GEFs), GTPasas, PLC α o γ y PI3K (Gough D. J. et al. 2008). Como ejemplo de ello se ha determinado que en células que carecen de Jak1 o Jak2, IFN γ induce la activación de PI3K, tal y como lo hace en células de fenotipo silvestre (Nguyen H. et al. 2001), aunque no se ha descartado la existencia de compensación por otras Jak.

5.2 Actividad biológica

Las actividades biológicas del IFN γ involucran tanto la inhibición de la replicación viral, así como sus capacidades anti-proliferativas e inmunomoduladoras (Johnson H. M. *et al*. 2005; Schoenborn J.

R. *et al.* 2007). La actividad antiviral inducida directamente por el IFN γ ha sido atribuido a la inducción de tres genes: PKR (proteín cinasa activada por RNA de doble cadena), 2'5' oligoadenilato sintasa y dsRAD (adenosin deaminasa específica). Todos estos genes codifican para proteínas cuya activación depende de la presencia de dsRNA (RNA de doble cadena), que interfieren con la replicación viral interfiriendo con la síntesis de proteínas (Boehm U. *et al.* 1997). En células B de ratón, el IFN γ induce el cambio de isotipo de IgM a IgG2a principalmente e IgG3 en menor proporción (Boehm U. *et al.* 1997). En monocitos y macrófagos, el IFN γ induce la producción de IL-12 (Boehm U. *et al.* 1997) y a través de ella, polariza a las células T CD4⁺ al fenotipo Th1, que son las células que median las respuestas celulares contra patógenos intracelulares y virus (Schoenborn J. R. *et al.* 2007; Savan R. *et al.* 2009). El IFN γ favorece la presentación de antígeno a través de la regulación positiva de la expresión de moléculas del MHC clase I y II, TAP1/2, la cadena invariante y aumentando la actividad del proteasoma (Johnson H. M. *et al.* 2005; Schoenborn J. R. *et al.* 2007), además de aumentar la expresión de las moléculas coestimuladoras B7.1 y B7.2, expresadas principalmente en macrófagos activados, células dendríticas, y células B y T activadas (Boehm U. *et al.* 1997). El IFN γ contribuye a la activación de macrófagos preparándolos para la producción de citocinas y la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Schoenborn J. R. *et al.* 2007). El IFN γ induce la activación clásica de macrófagos hacia un estado aumentado de actividad anti-microbiana. IFN γ ha mostrado inducir la transcripción de gp91-phox y gp67-phox en neutrófilos, monocitos y macrófagos aumentando la actividad de la NADPH oxidasa, además de regular positivamente la actividad de iNOS (óxido nítrico sintasa) (Boehm U. *et al.* 1997; Schroder K. *et al.* 2004). El IFN γ induce la secreción de IP-10 (CXCL10), MIP-1 α (CCL3) y 1 β (CCL4), RANTES (CCL5), MCP-1 (CCL2) en linfocitos, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y keratinocitos (Boehm U. *et al.* 1997; Schroder K. *et al.* 2004). Sin embargo ha sido reportado que IFN γ inhibe la migración de células mieloides en varios modelos *in vivo* e *in vitro* (Robson R. L. *et al.* 2001; Wu X. *et al.* 2006; Hu Y. *et al.* 2008), aún cuando la expresión de CCR1, CCR2, CCR3 y CCR5 no se modifica por la presencia del IFN γ (Hu Y. *et al.* 2008). El IFN γ induce además el reclutamiento de linfocitos y prolonga la activación de éstos en los tejidos, induciendo daño tisular (Schoenborn J. R. *et al.* 2007).

Además de los efectos descritos anteriormente en células monocíticas, se ha reportado que el IFN γ induce el aumento en la expresión del Fc γ RI (te Velde A. A. *et al.* 1992; de Waal Malefyt R. *et al.* 1993; Capsoni F. *et al.* 1995; Boehm U. *et al.* 1997; Keler T. *et al.* 2000; Schroder K. *et al.* 2004;

Wijngaarden S. et al. 2004) sin modificar significativamente la expresión de las otras clases de Fc γ Rs.

Los reportes acerca del efecto sobre una de las funciones efectoras mediadas por estos receptores, la fagocitosis, muestran resultados contradictorios. La gran mayoría de los trabajos reportan efecto negativo del IFN γ . En algunos de esos trabajos se incluyen también resultados de fagocitosis a través de otros receptores, en los que el efecto también es negativo (Jungi T. W. *et al.* 1987; Ruegg S. J. *et al.* 1988; Jungi T. W. *et al.* 1989; Schlesinger L. S. *et al.* 1991; Speert D. P. *et al.* 1991; Capsoni F. *et al.* 1995). Además de esas publicaciones, existen reportes que le atribuyen al IFN γ un efecto positivo sobre la fagocitosis mediada por Fc γ Rs (Fertsch D. *et al.* 1984; Keler T. *et al.* 2000; Noel B. L. *et al.* 2009; Quan Y. *et al.* 2009). Los trabajos en los se reporta que el IFN γ indujo descenso en la fagocitosis fueron hechos con células humanas, mientras que los otros fueron hechos en células monocíticas de ratón (a excepción del publicado por Keler y colaboradores), además en algunos casos los ensayos no permiten discernir entre las partículas internalizadas y las únicamente unidas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tanto IFN γ como IL-10 inducen un aumento en la expresión de Fc γ RI pero ambas producen efectos opuestos sobre la fagocitosis mediada a través de los Fc γ Rs. Mientras que IFN γ induce la disminución de la capacidad fagocítica mediada por Fc γ Rs, IL-10 la aumenta. Ya que estos efectos opuestos sobre la fagocitosis no pueden atribuirse al cambio en la expresión del Fc γ RI inducido por IFN γ e IL-10; entonces: ¿A qué se deben los efectos opuestos de estas citocinas sobre la fagocitosis mediada por Fc γ Rs? Los mecanismos moleculares por los cuales las células tratadas con IFN γ tienen una capacidad fagocítica disminuida no se conocen.

II. HIPÓTESIS

Los efectos opuestos de IL-10 e IFN γ sobre la fagocitosis mediada por Fc γ Rs se deben a efectos diferentes de estas citocinas sobre la señalización que conduce a la fagocitosis mediada por Fc γ R en MDMs.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si existen diferencias en algunos de los eventos de la señalización que conduce a la fagocitosis mediada por Fc γ R entre MDMs sin tratar y tratados con IFN γ o IL-10.

Objetivos particulares

1. Comparar los niveles de expresión de los receptores activadores Fc γ RI, Fc γ RIIa y Fc γ RIII, así como del inhibidor Fc γ RIIb, entre MDMs sin tratar y tratados con IFN γ o IL-10.
2. Determinar los niveles de activación de Syk en estado basal y posterior al tratamiento, así como tras la agregación del Fc γ RI o Fc γ RII.
3. Comparar los niveles de activación de Rac1 y Cdc42 en MDMs sin tratar y tratados con IFN γ o IL-10
4. Determinar si IFN γ o IL-10 modifican la movilización de calcio intracelular inducido tras el entrecruzamiento del Fc γ RI o Fc γ RII.
5. Determinar si el IFN γ o IL-10 modifican el nivel basal de actina polimerizada.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos y anticuerpos

El Suero Fetal Bovino (SFB), el medio de cultivo DMEM y las esferas de proteína A-agarosa fueron compradas a GIBCO Laboratories (Grand Island, NY). El Ficoll-Paque PLUS fue obtenido de GE Healthcare (Sweden). La albúmina sérica humana (BSA) y el compuesto 3,3'-diaminobenzidine (DBA) fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El ácido sulfónico 2,4,6-trinitrobenzeno (TNBS) y las películas fotográficas (Scientific imaging film) fueron comprados a Eastman Kodak Company (Rochester, NY). Los siguientes anticuerpos fueron producidos y purificados en nuestro laboratorio a partir de sobrenadantes de los hibridomas correspondientes comprados al ATCC: IgG1 monoclonal de ratón anti-Fc γ RI humano (32.2) y IgG2a monoclonal de ratón anti-Fc γ RII humano (IV.3). Estos anticuerpos fueron purificados por cromatografía de afinidad en columnas de Proteína G unida a agarosa. Los fragmentos Fab fueron preparados a partir de anticuerpos purificados usando Pepsina inmovilizada (Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante. El anticuerpo monoclonal IgG2b de ratón anti-DNP (4F8), fue producido a partir del sobrenadante del hibridoma 4F8 generado en nuestro laboratorio. El anticuerpo monoclonal de ratón IgG1 anti-Fc γ RIIIA humano (3G8, anti-CD16) conjugado con FITC fue comprado a Beckman Coulter (San Diego, CA). Los controles de isotipo IgG1 e IgG2a murinos fueron obtenidos de CALTAG Invitrogen (Carlsbad, CA). Los anticuerpos policlonales IgG de cabra anti-Fc γ RIIIa (CD32-A) y anti-Fc γ RIIIb (CD32-B) humanos, así como el anticuerpo anti-Syk, el anticuerpo anti-fosfotirosina acoplado a peroxidasa (PY-20-HRP) y las esferas de agarosa cubiertas con anticuerpo anti-Syk (IgG policlonal de conejo anti-Syk) fueron comprados a Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). La solución de permeabilización (Perm/Wash) para la tinción intracelular fue obtenida de BD Biosciences (San Diego, CA). Los fragmentos F(ab) $'_2$ de anticuerpo IgG de cabra anti-IgG de conejo, IgG anti-rabbit IgG (H+L) conjugado con HRP y la IgG de conejo anti-IgG(H+L) de cabra, fueron comprados a Zymed (San Francisco, CA). El IFN γ recombinante humano (rh-IFN γ) fue obtenido de R&D Systems (Minneapolis, MN) y de PeproTech (Rocky Hill, NJ). La N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)phallacidin (NBD-phallacidina) y el kit *Vibrant Phagocytosis Assay V6694* que contiene *Escherichia coli* (cepa K-12) conjugada con FITC fueron comprados a Invitrogen (Eugene, Oregon). Los fluoróforos Fluo-3 AM y Fura Red AM se obtuvieron de Molecular Probes (Eugene, Oregon). El inhibidor LY294002 se compró a CALBIOCHEM (La Jolla, CA). Para la

detección de Rac1 y Cdc42 humana se utilizaron anticuerpos monoclonales IgG1 murinos anti-Rac1 y anti-Cdc42 humanas que se compraron a BD Transduction Laboratories.

2. Purificación y cultivo de monocitos humanos

Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) fueron aisladas por centrifugación en gradientes de densidad (Ficoll-Paque PLUS) partiendo de paquetes leucocitarios (buffy coats) de donadores sanos, que nos fueron donados por el Banco de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS. Después de lavar las células 4 veces con PBS pH 7.5, las PBMCs fueron cultivadas por 30 min a 37°C con RPMI-1640 complementado con 10% (v/v) de plasma autólogo inactivado con calor, además de solución de piruvato de sodio MEM a 1mM, solución de aminoácidos esenciales MEM a 2 mM, L-glutamina a 0.1 mM, penicilina 100 U/ml, y estreptomicina 100 mg/ml, para permitir la adhesión de los monocitos al plástico. Las células no adherentes fueron eliminadas por lavados consecutivos con PBS. Las células adherentes, consideradas células enriquecidas en monocitos, fueron teñidas para determinar la pureza. La pureza se evaluó determinado por citometría de flujo la expresión de CD14, como marcador de población monocítica. Más del 90% de pureza fue obtenida en cada uno de los aislamientos realizados. Las células adherentes fueron cultivadas por 6 días en RPMI-1640 complementado con 10% (v/v) de SFB inactivado por calor en una atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂. Al término de los 6 días de incubación, los macrófagos derivados de monocitos (MDM) fueron cosechados mecánicamente con un gendarme estéril para su cultivo con IFN γ o IL10 durante 48 horas más. Para los ensayos de fagocitosis de *E. coli* y tinción de F-actina las células fueron sembradas en placas de 6 pozos Nunclon (Nalge Nunc International). Para los demás ensayos (determinación de expresión de Fc γ Rs, flujos de calcio, inmunoprecipatación de Syk y pull down de Rac1 y Cdc42) las células fueron cultivadas en cajas petri (Corning) de 100mm x 20 mm. Los ensayos de fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG se realizaron posteriores al cultivo por 48 h con cada citocina en placas de fondo plano de 96 pozos (Costar).

3. Inmunofluorescencia indirecta: expresión de Fc γ Rs por citometría de flujo

Los MDMs se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 cels/mL en solución de lavados (PBS con 5% de SFB y 0.1% de azida de sodio). Se colocaron 3×10^5 células por tubo para FACS, y fueron incubadas en presencia de 10 μ g de anticuerpo anti-Fc γ RI (32.2) o Fc γ RII (IV.3) por 30 minutos a 4°C. Después de realizar 3 lavados con solución de lavados, las células se incubaron con el segundo

anticuerpo (anti-IgG murina-FITC 0.45 $\mu\text{g/ml}$) por 30 minutos a 4 °C, protegidos de la luz. Posteriormente las células se lavaron y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 1% en PBS por 20 minutos a 4 °C, protegidos de la luz. Finalmente se lavaron, se resuspendieron en PBS y se analizaron por citometría de flujo (FACS Scan, Becton Dickinson).

Para la tinción intracelular de las isoformas Fc γ RIIIa y Fc γ RIIb se partió de una suspensión celular de 1×10^6 MDMs. Las células fueron incubadas en PFA al 4% en PBS pH 7.5, por 10 minutos a 4°C. Las células fueron lavadas dos veces con PBS, y posteriormente incubadas 15 minutos en solución Perm/Wash a 4°C. Después de lavar las células, se agregó anti-Fc γ RIIIa (CD32A) o anti-Fc γ RIIb (CD32B) diluido 1:200 en solución Perm/Wash. Las células fueron incubadas 30 minutos a 4°C. Para bloquear el pegado inespecífico del anticuerpo secundario se usó una dilución 1:150 de inmunoglobulinas humanas comerciales (Beriglobina P, CSL Behring, Ciudad de México). Después de que las células fueron incubadas 30 min a 4°C y lavadas, se les adicionó el anticuerpo secundario (IgG de conejo anti-IgG de cabra FITC), diluido 1:600. Posterior a la incubación por 30 min a 4°C en la oscuridad, las células fueron resuspendidas en PFA al 1% y analizadas de inmediato por citometría de flujo.

4. Estimulación celular e inmunoprecipitación

Previo a la incubación con 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo 32.2 o IV.3 los MDM (3×10^6 cels/ml) fueron mantenidas en RPMI-1640 sin suero por 10 min a 4°C. Después de 10 min de incubación a 4°C con los anticuerpos completos 32.2 o IV.3, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 1 ml de RPMI-1640 con 3 % de SFB y se les agregaron 10 $\mu\text{g/ml}$ de fragmentos F(ab) $_2$ de IgG de conejo anti-IgG de ratón para inducir el entrecruzamiento de los Fc γ R. La estimulación fue detenida después de 3 min a 37°C adicionando 500 μl de PBS frío. Las células fueron lisadas en 400 μl de solución de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM Na $_3$ VO $_4$, 1 mM PMSF, 10 mM NaF y 1 mg/ml of Pepstatina A, Leupeptina y Aprotinina) en hielo (15 min). Los restos celulares fueron retirados por centrifugación a 14,000 rpm por 15 min a 4°C. La concentración de proteínas en los lisados celulares fue determinada usando el ensayo de DC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la inmunoprecipitación, los lisados fueron incubados por 3 h a 4°C con esferas de proteína A-agarosa cubiertas con anticuerpo anti-Syk. Los inmunoprecipitados fueron lavados cinco veces con solución de lisis y una vez más con agua adicionada con inhibidores de proteasas y fosfatasas.

Finalmente, las esferas fueron hervidas por 5 min en buffer para muestra de Laemmli en condiciones reductoras y separadas en un gel SDS-PAGE al 10 % para posteriormente someterlos a inmunoblot.

5. Inmunoblot

Los inmunoprecipitados o los lisados celulares fueron separados mediante SDS-PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con BSA al 3% en TBS-Tween 20 0.05% (TBS-T) (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.05 % Tween-20) toda la noche a 4° C. Posteriormente las membranas fueron incubadas con anticuerpo anti-fosfotirosina conjugado con HRP (HRP PY-20) diluido 1:1000 en solución de bloqueo por 1.5 h a temperatura ambiente. Se reveló usando el kit de quimioluminiscencia aumentada Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, U.S.A.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y exponiendo los blots a películas fotográficas. Las imágenes fueron digitalizadas usando el equipo Gel-Doc 2000 System y se analizaron con el software Quantity One (ambos de Bio-Rad). En los casos indicados en las figuras correspondientes, las membranas fueron tratadas para eluir los anticuerpos primarios y secundarios, y fueron reveladas de nueva cuenta usando diferentes anticuerpos primarios y secundarios. La elución de los anticuerpos de las membranas se realizó incubando las membranas con glicina 0.1 M, pH 2.5, durante 1.5 h a 60° C. Después de lavar las membranas, estas fueron nuevamente bloqueadas e incubadas con el anticuerpo anti-Syk diluido 1:1000 en solución al 3% de BSA en TBS-T por 1.5 h a temperatura ambiente. Después de lavadas, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-IgG de conejo) conjugado con HRP diluido 1:7000 en solución de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente. Las membranas fueron procesadas como se describió antes para el desarrollo de la señal en los blots, así como para la captura y análisis de la imagen en película fotográfica.

6. Fagocitosis mediada por FcγRs

Los eritrocitos de carnero recién extraídos fueron mantenidos a 4° C en solución de Alsever. La sensibilización de los eritrocitos con TNBS se llevó a cabo una semana después de extraídos. Los eritrocitos se lavaron dos veces en solución de DGVB²⁺ estéril (Veronal 2.5 mM, NaCl 75 mM, dextrosa 2.5%, gelatina 0.05%, CaCl₂ 0.15 mM, MgCl₂ 0.5 mM, pH 7.5) y fueron sensibilizados con TNBS. Por cada mililitro de pellet de eritrocitos se utilizaron 1.55 mg de TNBS disueltos en 7 ml de amortiguador de boratos, pH 8.5. La incubación con TNBS se llevó a cabo en obscuridad con agitación suave por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente los eritrocitos sensibilizados fueron

lavados tres veces con DGVB²⁺ y fueron resuspendidos en RPMI sin suero. El título de hemaglutinación del anticuerpo 4F8 fue determinado como la concentración más baja a la que al anticuerpo produce aglutinación visible de los eritrocitos. La opsonización con IgG de los eritrocitos sensibilizados con TNBS (E-TNBS) se realizó incubando una suspensión al 1% de E-TNBS en RPMI con una dilución del anticuerpo 4F8 a una concentración sub-hemaglutinante en hielo por 60 minutos. Para el ensayo de fagocitosis, los MDM fueron sembrados con o sin citocinas (IFN γ o IL-10) 48 h antes del ensayo en placas de 96 pozos, colocando 1×10^5 células en 200 μ l de RPMI (complementado con 10% SFB) por pozo. Un volumen de 25 μ l de una suspensión al 1% de E-TNBS o eritrocitos opsonizados con IgG (EIgG) fue agregado a cada pozo, y las placas incubadas 30 minutos a 37° C dentro de la incubadora con 5% de CO₂. Después de dicha incubación, las placas fueron lavadas con PBS para remover los eritrocitos no unidos, y los eritrocitos no internalizados fueron lisados con agua destilada. En cada ensayo de fagocitosis se trabajó por duplicado. La fagocitosis fue evaluada mediante el ensayo de oxidación de DBA diseñado por Jungi (Jungi T. W. 1985). Después de remover el contenido de los eritrocitos lisados no internalizados, los fagocitos fueron lisados con detergente y la actividad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina fue evaluada en los lisados. La absorbancia a 492 nm fue determinada usando un lector de ELISA. El incremento en la fagocitosis fue calculado considerando la absorbancia de los MDM no tratadas (control) expuestos a EIgG como el 100%.

7. Determinación de la concentración intracelular de iones Ca²⁺ por citometría de flujo

Para evaluar los cambios en la concentración intracitoplasmática de iones de Ca²⁺ se utilizaron los fluorocromos Fluo-3 y Fura Red. Los MDM (5×10^6) fueron incubados con 6 μ g/ml de Fluo-3 y 10 μ g/ml de Fura Red en presencia de ácido plurónico (5 mg/ml) por 45 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente los MDM se lavaron con RPMI con 2% de SFB y fueron incubados nuevamente en la oscuridad por 45 min a temperatura ambiente. Una vez teñidos, los MDM se mantuvieron a 4°C en RPMI sin suero hasta que se llevó a cabo el ensayo. La respuesta celular al entrecruzamiento de los Fc γ RI y Fc γ RII fue analizada por citometría de flujo usando el FACSCan y el software CellQuest (ambos de Becton Dickinson). La fluorescencia basal de los MDM en reposo fue capturada durante 30 a 50 segundos. Tras la adición de los fragmentos Fab de anti-Fc γ RI or II (anticuerpos 32.2 o IV.3) la respuesta celular se capturó durante 6 minutos. Después de agregar los F(ab)₂' de cabra anti-IgG de ratón (H+L) para entrecruzar los Fc γ Rs, se capturó la

respuesta celular por 5 minutos más. Los resultados fueron analizados como el cociente de la MGF del fluoroforo Fluo-3 entre la MGF del Fura Red en cada tiempo.

8. Tinción de F-actina

El nivel de F-actina fue determinada usando NBD-phalloidina. Después de 48 h de tratamiento con IFN γ o IL-10, 1×10^6 MDM se resuspendieron en 300 μ l para analizar en cada condición los niveles de F-actina posteriores al tratamiento así como las respuestas a la estimulación con CCL5. Previo a la tinción, los MDM fueron fijados en formaldehído al 7.5 % durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Posteriormente los MDM fueron permeabilizados y teñidos al mismo tiempo con 40 μ l de una solución que contiene 0.25 mg de lisofosfatidil colina, 20 unidades de NBD-phalloidina, 200 μ l de formaldehído al 37% y 700 μ l de PBS. Los MDM fueron después incubados a temperatura ambiente por 1 h en la oscuridad. Finalmente, los MDM teñidos fueron analizados por citometría de flujo en un FACScan empleando el software CellQuest. El porcentaje de F-actina basal fue calculado considerando la media de fluorescencia de los MDM sin tratamiento como el 100%.

9. Fagocitosis de *E.coli*

Los ensayos de fagocitosis de *E.coli* fueron realizados usando el kit Vybrant Phagocytosis assay. La suspensión de *E. coli*-FITC fue preparada siguiendo las instrucciones del fabricante. La suspensión de MDM (1×10^6 células) tratados o no tratados, fue incubada con 50 μ l de la suspensión de *E.coli*-FITC durante 20 min a 37 °C. Los controles negativos fueron preparados en condiciones idénticas pero fueron incubados a 4°C. La fagocitosis fue detenida lavando con PBS frío. Las muestras fueron fijadas con PFA al 4% y conservadas a 4°C hasta su análisis por citometría de flujo. Con el objetivo de eliminar la fluorescencia de las bacterias unidas pero no internalizadas, se agregó azul tripán (1 mg/ml, en buffer de citratos, pH 4.5) justo antes de capturar la muestra en el citómetro de flujo. El índice fagocítico fue calculado multiplicando la MGF de las células positivas por el porcentaje de células positivas. El control a 4°C fue usado para establecer los límites de la población negativa. La normalización del índice fagocítico fue calculada como el cociente del índice fagocítico de los MDM tratados entre el índice fagocítico de los MDM control.

10. Pull down de Rac-GTP y Cdc42-GTP

Los MDMs fueron sembrados 48 h antes del ensayo con o sin IFN γ (300 ng/ml) o IL-10 (20 ng/ml) a una densidad de 10×10^6 en 3 ml de RPMI complementado al 10 % de SFB en cajas Petri de 10 cm. Antes del ensayo se lavaron las células con PBS y se lisaron en 1 ml de buffer de lisis frío (50 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, y 1% Tritón X-100) con inhibidores de proteasas (10 μ g/ml aprotinina, 10 μ g/ml leupeptina, 1 mM PMSF, 10 mM β -glicerol fosfato, 1 mM NaF, 1 mM ortovanadato de sodio y 10 mM MgCl₂). Los lisados fueron centrifugados para eliminar los restos celulares. De los sobrenadantes se tomaron alícuotas para determinar los niveles totales de Rac1 y Cdc42. El resto del lisado se incubó por 42 minutos a 4 °C con 50 μ l de perlas recubiertas con el GST-PAK CRIB. Estas perlas están recubiertas con la proteína de fusión formada por el motivo CRIB de PAK unido a GST (GST-PAK CRIB). El motivo CRIB es la porción de PAK, un efector en la señalización río abajo de Rac y Cdc42, que está definido como motivo de interacción con Rac y Cdc42 (Cdc42/Rac interactive binding). Este dominio sólo es capaz de interactuar con Rac o Cdc42 una vez que estas GTPasas están unidas a GTP, es decir, están activas. De este modo a partir de lisados totales las perlas sólo unen las formas activadas de Rac-1 y Cdc42. Transcurrido el tiempo de incubación las perlas se lavaron 3 veces con 1 ml de buffer de lisis y fueron resuspendidas en 40 μ l de buffer de muestra para proteínas y hervidas por 5 minutos. Después de la electroforesis de los sobrenadantes eluidos, las proteínas fueron transferidas a una membrana Immobilon (Millipore, Billerica, MA), y se revelaron empleando los siguientes anticuerpos: IgG1 monoclonal de ratón anti-Rac1 humana o IgG1 monoclonal de ratón anti-Cdc42 humana, y ambos fueron revelados con IgG de cabra anti-IgG de ratón-HRP. Se utilizó como sustrato quimioluminiscente la solución Immobilon Western HRP substrate peroxide solution (Millipore, Billerica, MA). La señal quimioluminiscente fue capturada en película fotográfica. Después del revelado, las imágenes fueron digitalizadas usando el analizador de imágenes Gel-Doc 2000 System (Bio-Rad) y los resultados fueron analizados usando el software Quantity One de Bio-Rad.

11. Análisis estadístico

Los controles (MDM sin tratar) fueron comparados contra los tratamientos (IL-10 o IFN α) usando la prueba de *t* de Student, pareada a dos colas, al 95 % de confianza. Para el cálculo de *p* se utilizó el programa Minitab.

V. RESULTADOS

El IFN γ regula negativamente la fagocitosis de EIgG en MDM, mientras que IL-10 la regula positivamente

Se evaluó la internalización de EIgG por MDM previamente tratados con diferentes concentraciones de IFN γ o IL-10 durante 48 h. El tratamiento con IFN γ redujo significativamente la fagocitosis de EIgG, mientras que en las células tratadas con IL-10 la fagocitosis se incrementó entre un 30 y un 75 % (Fig. 6). Ninguno de los tratamientos indujo cambios en la fagocitosis de eritrocitos no opsonizados (datos mostrados en la figura 8).

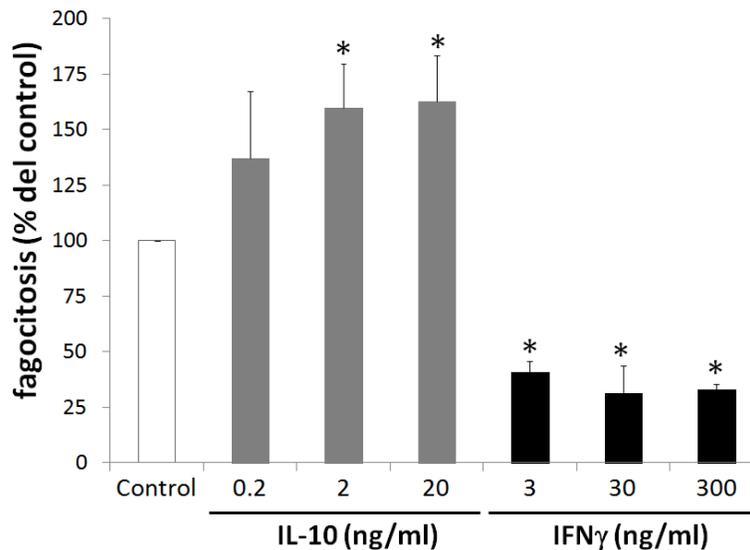


FIGURA 6. El IFN- γ inhibe la fagocitosis de EIgG. Los MDMs fueron tratados con concentraciones crecientes de IL-10 o IFN γ . Después de 48 h, los MDMs fueron incubados con EIgG por 30 minutos a 37°C. Los eritrocitos no internalizados fueron lisados con un choque osmótico. La fagocitosis fue evaluada mediante una reacción colorimétrica basada en la oxidación de DBA. La absorbancia fue determinada a 492 nm. Los porcentajes de fagocitosis fueron calculados considerando la absorbancia de la fagocitosis de las células control como el 100%. Los datos presentados corresponden al promedio de tres experimentos independientes (MDMs provenientes de tres donadores diferentes). Ver detalles del ensayo en materiales y métodos. Las barras de error representan las desviaciones estándar. * = diferencia estadística significativa, $p < 0.05$ determinada por t de Student pareada a dos colas, comparando MDMs sin tratar contra MDMs tratados (IL-10 o IFN γ).

Con el objetivo de determinar si el efecto de IFN γ e IL-10 observado en la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG dependía del isotipo de IgG que recubriera a la partícula, se realizaron ensayos en los que se opsonizó a los eritrocitos de carnero con anticuerpos de distinto isotipo. Se compararon los niveles de fagocitosis de eritrocitos opsonizados con anticuerpos anti-DNP de ratón de las subclases IgG1, IgG2a o IgG2b, así como IgG de conejo, entre células tratadas o no con IFN γ o IL-

10. En la figura 7 se muestran los resultados. Los eritrocitos fueron opsonizados usando concentraciones sub-hemaglutinantes para cada uno de los anticuerpos. A pesar de que unos isotipos de anticuerpo fueron más eficientes que otros para promover la fagocitosis de los eritrocitos que recubren, en todos los casos IL-10 indujo el aumento en la fagocitosis, mientras que IFN γ siempre tuvo un efecto negativo.

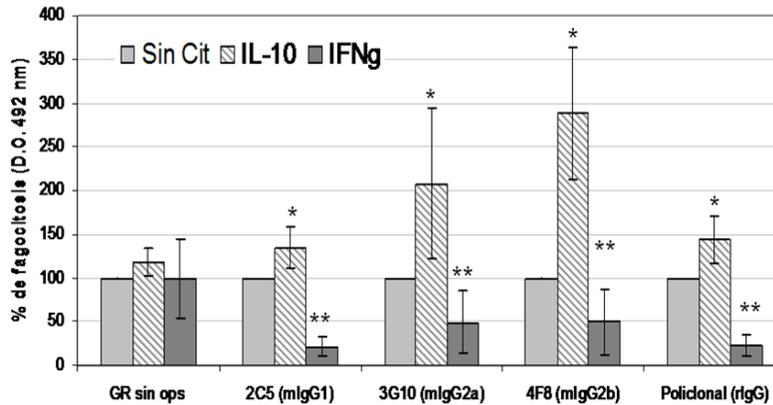


FIGURA 7. El efecto positivo de IL-10 y el negativo de IFN- γ sobre la fagocitosis no depende del isotipo de IgG opsonizante. MDM fueron tratados con IL-10 (20 ng/ml) o IFN γ (3 ng/ml). Después de 48 h, los MDMs fueron incubados con EIgG opsonizados con anticuerpos IgG anti-DNP de diferente isotipo por 20 minutos a 37°C. Los eritrocitos no internalizados fueron lisados con un choque osmótico. La fagocitosis fue evaluada mediante una reacción colorimétrica basada en la oxidación de DBA. La absorbancia fue determinada por espectroscopia a 492 nm. Los porcentajes de fagocitosis fueron calculados como el cociente de la absorbancia de la fagocitosis de las células control sobre la absorbancia de la fagocitosis de las células tratadas. Los datos presentados corresponden al promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error representan las desviaciones estándar. *= diferencia estadísticamente significativa, p < 0.05 determinada por t de Student pareada a dos colas, comparando MDMs sin tratar contra MDMs tratados (IL-10 o IFN γ).

Efecto de IFN γ e IL-10 sobre la expresión de las clases activadoras e inhibitoras de los Fc γ Rs en MDM

Con el objetivo de determinar si los cambios inducidos sobre la fagocitosis se debían a cambios en la expresión de los Fc γ Rs inducidos por el IFN γ o la IL-10, se determinó mediante citometría de flujo, la expresión de los Fc γ Rs en MDMs tratados o no con las citocinas. Como previamente se reportó, encontramos que el IFN γ regula positivamente la expresión del Fc γ RI (Fig. 8A). En cuanto a la expresión del Fc γ RIII, se encontró que el IFN γ induce una disminución moderada, aunque estadísticamente significativa, de la expresión de esta isoforma. Encontramos que además del aumento en la expresión del Fc γ RI (reportada previamente), IL-10 induce el aumento en la expresión del Fc γ RII y Fc γ RIII (Fig. 8A). Además de las tinciones de superficie se realizaron tinciones

intracelulares para poder discriminar entre las isoformas a y b del receptor FcγRII (FcγRIIa y FcγRIIb), isoformas activadoras e inhibitorias respectivamente, cuya homología extracelular impide reconocerlas con anticuerpos dirigidos contra las porciones de superficie de ambas isoformas. Ni IFNγ ni IL-10 modificaron la expresión del FcγRIIa (Fig. 8B). El IFNγ indujo la disminución en la expresión del FcγRIIb, mientras que IL-10 indujo el aumento (Fig. 8B).

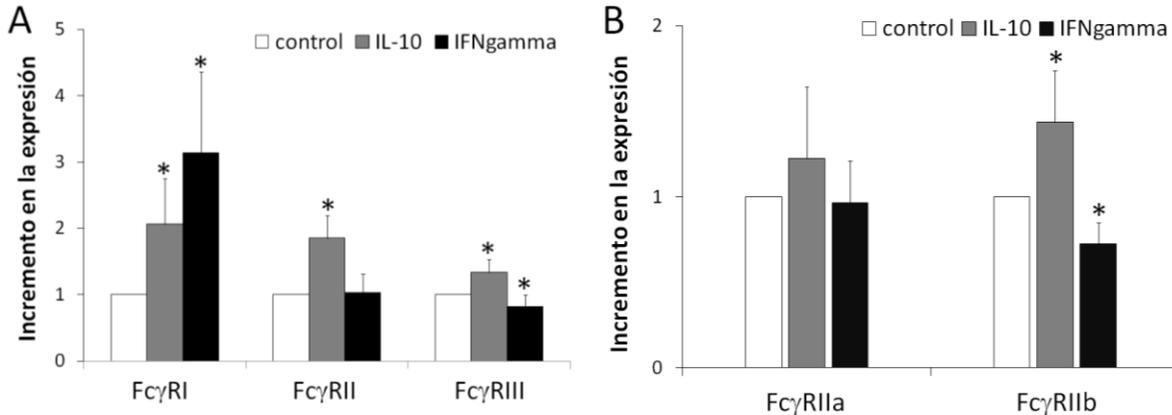


FIGURA 8. Efecto de IL-10 e IFN-γ sobre la expresión de FcγR en MDM. MDM fueron tratados con IFNγ (3 ng/ml) o IL-10 (20 ng/ml). Después de 48 h en cultivo, los MDM fueron cosechados y teñidos con anticuerpos específicos anti-FcγR. Ver detalles en materiales y métodos. El incremento en la expresión fue calculado como el cociente entre las MGF de MDM tratados entre las MGF de los no tratados (control). **A**, muestra los incrementos promedio de 13 donadores, mientras que en **B** se presenta el promedio de 5 donadores. Las barras de error representan las desviaciones estándar.*= diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.05$ determinada usando la prueba t Student pareada a dos colas. Se compararon MDM control (sin tratamiento) contra MDM tratadas (IL-10 o IFNγ).

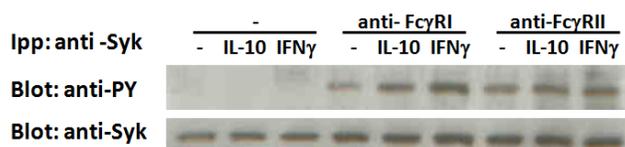
Aunque el IFNγ modifica la expresión de los FcγRs, los cambios inducidos no explican el efecto negativo sobre la fagocitosis mediada por FcγRs. Tanto IL-10 como IFNγ favorecen el balance final de la expresión de las isoformas de FcγRs activadoras. Mientras que el aumento en la expresión de los FcγR activadores inducido por IL-10 correlaciona con el aumento en la fagocitosis mediada por estos receptores, para IFNγ esta correlación no existe. El que IFNγ induzca una mayor expresión de receptor en superficie no implica aumento en la capacidad fagocítica, lo cual significa que el efecto de IFNγ podría estar modificando las señalización mediada por FcγRs.

Efecto de IFN γ e IL-10 sobre la fosforilación de Syk en respuesta al entrecruzamiento de los Fc γ Rs

Para poder identificar el nivel en la señalización a través de Fc γ Rs en el cual IFN γ ejerce el efecto negativo sobre la fagocitosis, se buscaron diferencias en la señalización a través de Fc γ R en MDMs tratados y no tratados previamente con IFN γ y se comparó con células tratadas con IL-10, cuyo efecto sobre la fagocitosis es el contrario.

Una de las enzimas involucradas en la señalización mediada por Fc γ Rs, cuya participación es indispensable para el proceso fagocítico es Syk (Crowley M. T. et al. 1997; Kiefer F. et al. 1998). La cascada de señalización activada tras el entrecruzamiento de Fc γ Rs se inicia con la fosforilación de las tirosinas del ITAM de los Fc γ Rs. Tras dicha fosforilación, se recluta a Syk la cual se une a través de sus dominios SH2 a las tirosinas fosforiladas del ITAM. Esta unión induce la activación de Syk, que una vez activada conduce a los eventos de señalización corriente abajo.

Para evaluar el efecto del tratamiento con las dos citocinas sobre la fosforilación de Syk, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de Syk en los que se partió de MDMs cultivados con o sin IL-10 o IFN γ . Los MDMs tratados o no con citocinas, fueron estimulados a través de Fc γ Rs usando anticuerpos específicos contra Fc γ RI o II. La presencia de Syk fosforilada fue revelada usando anticuerpos anti-PY y ubicando la banda por medio del peso molecular. Los resultados muestran que los tratamientos con IFN γ o IL-10 no modifican el nivel basal de fosforilación de Syk (las cantidades de Syk fosforiladas fueron tan bajas que no se detectó proteína fosforilada antes de entrecruzar al receptor). El nivel de fosforilación de Syk después del entrecruzamiento del Fc γ RI fue casi 2 veces más alto en MDMs cultivados con IL-10 que en los MDMs sin tratar, mientras que en MDMs cultivados IFN γ el incremento es de casi 3 veces (Fig 9). Cuando los MDMs tratados con IFN γ o con IL-10 fueron estimulados a través del Fc γ RII el nivel de fosforilación de Syk fue el mismo que en MDMs sin tratamiento (Fig. 9). Estos resultados sugieren que la inhibición de la fagocitosis inducida por el tratamiento con IFN γ no resulta del desacoplamiento entre la agregación de los Fc γ Rs y la fosforilación de Syk.



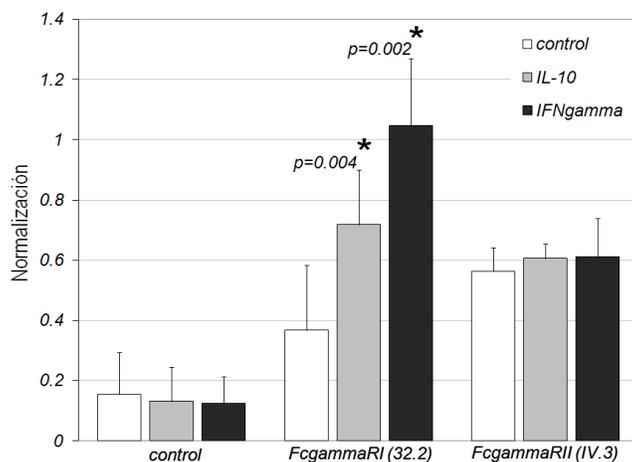


FIGURA 9. La fosforilación de Syk mediada por FcγRI es más alta tanto en MDMs tratados con IFNγ como en MDMs tratados con IL-10. Después de 48 h de tratamiento con IL-10 (20 ng/ml), IFNγ (3 ng/ml) o sin tratar, los MDMs fueron estimulados con anticuerpos monoclonales específicos anti-FcγRI (32.2) o anti FcγRII (IV.3) y un anticuerpo secundario anti-IgG murina (IgG de cabra anti-IgG de ratón) para entrecruzar a los receptores. Las células fueron lisadas y las proteínas resueltas mediante SDS-PAGE. Las proteínas que contenían tirosinas fosforiladas fueron detectadas usando anticuerpo anti-PY (Blot anti-PY). En el panel superior se muestran las bandas correspondientes a 72 kDa. En el blot inferior se muestra el revelado de ese mismo blot usando anticuerpos anti-Syk (Blot anti-Syk). La fosforilación de Syk fue calculada como el cociente de las densidades ópticas del blot anti-PY entre la densidad óptica del blot anti-Syk. En la gráfica se presentan las normalizaciones promedio de 4 experimentos independientes. Las barras de error representan las desviaciones estándar. *= diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.05$ determinada usando la prueba de t Student pareada a dos colas. Se compararon controles contra tratamientos.

La respuesta de calcio inducida por el entrecruzamiento de los FcγRs es la misma en MDMs tratados o no con IFNγ, mientras que en MDMs cultivados con IL-10 se intensifica la respuesta

Como parte de la cascada de señalización inducida por la agregación de los FcγRs se genera un incremento transitorio de la concentración de calcio intracelular (Larsen E. C. et al. 2000; Greenberg S. 2001). Con el objetivo de determinar si el tratamiento con IFNγ o IL-10 modifica la respuesta de calcio inducida por la agregación de los FcγRs en MDM, se realizaron ensayos de flujo de calcio por citometría de flujo. Para evaluar el flujo de calcio inducido por el entrecruzamiento de los FcγRs, se usaron fragmentos (Fab) de anticuerpos específicos contra el FcγRI o FcγRII y fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos anti-IgG de ratón producidos en cabra. Los resultados muestran que el tratamiento con IFNγ no inhibe el incremento en $[Ca^{2+}]_i$ después de la agregación de los receptores FcγRI o FcγRII inducida por anticuerpo (Fig. 10). Si bien ni las cinéticas ni los máximos alcanzados son idénticos, el efecto del 50% de disminución en la capacidad fagocítica no puede atribuirse a modificaciones tan sutiles. El cultivo previo con IL-10 indujo una respuesta más intensa tras el entrecruzamiento tanto

del FcγRI como del FcγRII. En los puntos máximos, IL-10 alcanza un pico 40% más alto al estimular a través del FcγRI y 25% más alto cuando se entrecruza al receptor FcγRII, comparado con las células no tratadas.

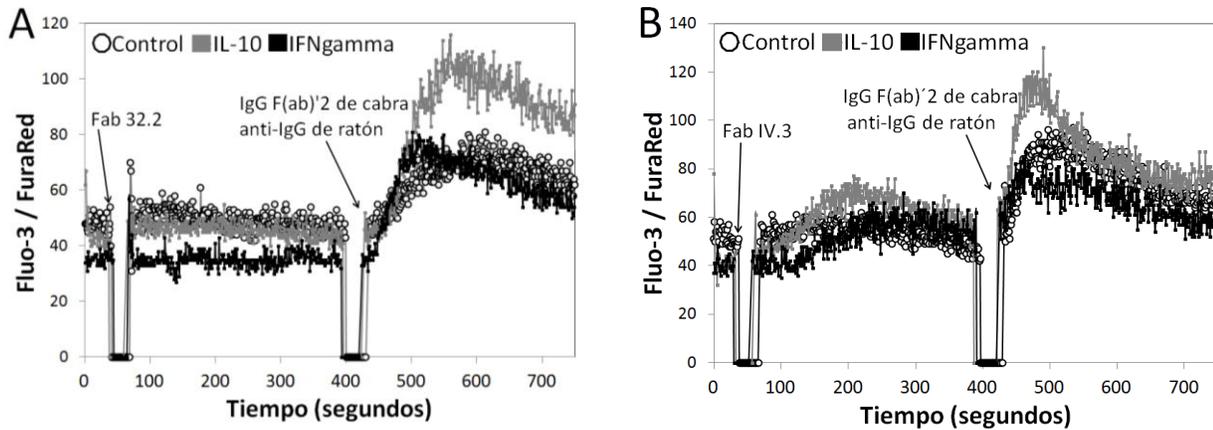


FIGURA 10. El IFN γ no modifica el incremento de calcio inducido tras el entrecruzamiento de Fc γ RI y Fc γ RII en MDMs. Después del tratamiento de 48 h, los MDMs fueron estimulados a través de Fc γ Rs usando fragmentos Fab anti-Fc γ RI (Fab 32.2) mostrado en **A**, o anti-Fc γ RII (Fab IV.3) mostrado en **B**. Se usaron fragmentos (Fab) $_2$ anti-IgG de ratón para inducir el entrecruzamiento del receptor. El flujo de calcio fue analizado por citometría de flujo. Los rótulos Fab 32.2, FabIV.3 e IgG F(ab) $_2$ de cabra anti-ratón indican el momento en que se adicionaron a las células. Se muestra un experimento representativo de 4.

IFN γ induce polimerización de actina

La fagocitosis es un proceso dependiente de la polimerización de actina (Zigmond S. H. *et al.* 1972; Axline S. G. *et al.* 1974; Greenberg S. *et al.* 1991; Swanson J. A. 2008). Para evaluar si el tratamiento de MDMs con IFN γ modifica los niveles de F-actina, se empleó la tinción de F-actina con NBD-phalloidina y se analizó por citometría de flujo. Los resultados muestran que los MDMs cultivados en presencia de IFN γ por 48 h tienen entre el 20 y 70 % más actina polimerizada comparados con células control (Fig. 11A). El tratamiento con IL-10 no modifica los niveles de F-actina (Fig. 11A). Posteriormente, se analizó el efecto de IFN γ en la polimerización de actina inducida por el entrecruzamiento de Fc γ R, necesario para internalizar los EIgG. Los niveles de F-actina se incrementaron después de 3 minutos de estimulación con EIgG en los MDMs no tratados (Fig. 11B), mientras que los niveles de F-actina no se incrementaron en MDMs tratados con IFN γ en respuesta a la estimulación (Fig. 12C).

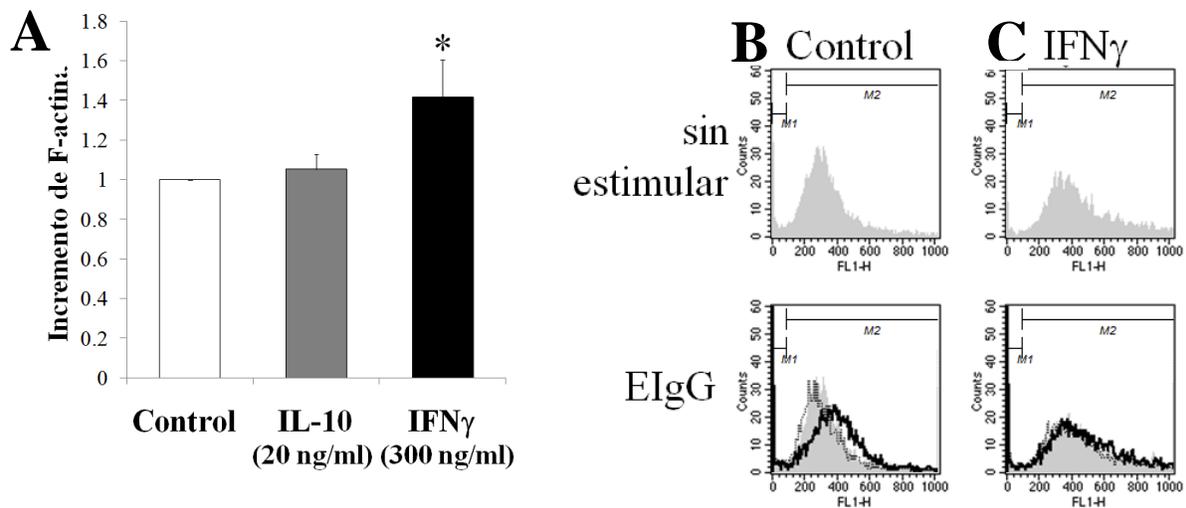


FIGURA 11. A. IFN γ induce la polimerización de actina, mientras que IL-10 no modifica los niveles basales de F-actina. Después del tratamiento por 48 h, los MDMs fueron teñidos usando NBD-phalloidina y analizados por citometría de flujo. **A.** Se muestra el incremento promedio de F-actina en MDMs tratados con IFN γ o IL-10 (n=7) con respecto al control (n=17). Las barras de error representan las desviaciones estándar. *= diferencia estadísticamente significativa, p< 0.05 determinada usando la prueba de *t* Student pareada a dos colas. Se compararon controles contra tratamientos. Los niveles de F-actina fueron determinados usando NBD-phalloidina y fueron analizados por citometría de flujo. La columna **B** representa los MDMs sin tratamiento y la **C** muestra MDM tratados con IFN γ (300 ng/ml). El estímulo dado en cada caso se indica a la izquierda. Los histogramas superiores muestran los niveles iniciales de F-actina antes de que las células fueran estimuladas con EIGG. Los MDMs tratados o no con IFN γ fueron estimulados por 3 minutos con E-TNBS (línea gris) o EIGG (línea negra) y comparados con los MDMs sin estimular (histograma sombreado). Se muestra el resultado representativo de uno de tres experimentos independientes.

Si la polimerización de actina inducida por IFN γ es responsable de la disminución de la capacidad fagocítica mediada por Fc γ Rs, entonces el efecto sobre la fagocitosis debería ser independiente del receptor fagocítico involucrado. Para probar esta hipótesis, analizamos el efecto del tratamiento con IFN γ sobre la fagocitosis de *E.coli* teñida con FITC y evaluamos la internalización de las bacterias por citometría de flujo. Como se esperaba, los MDM tratados con IFN γ internalizaron entre 50 y 75 % menos bacterias que los MDM cultivados en ausencia de IFN γ (Fig 12B y 12E), mientras que los MDMs tratados con IL-10 internalizaron entre 30 y 120 % más bacterias con respecto a MDM control (Fig 12B y 12E). La capacidad de unir bacteria entre los MDM tratados y sin tratar es muy similar (Fig 12A). Cuando analizamos el efecto del tratamiento con IFN γ sobre MDM de distintos donadores, observamos que existe una relación inversa entre la cantidad de F-actina tras el tratamiento con IFN γ , y la capacidad fagocítica que presentan esos MDMs. En la Figura 13 se presentan los resultados de células provenientes de 4 donadores distintos en los que se observa que a un valor de F-actina basal alto le corresponde una capacidad fagocítica aún más baja que si se

compara con otro donador en el que el nivel de F-actina inducido por el tratamiento con IFN γ es menor, en donde la capacidad fagocítica se ve menos afectada. Estos resultados sugieren que conforme más altos sean los niveles de actina polimerizada previa a la fagocitosis, menor será la capacidad de responder a estímulos que requieran del rearrreglo del citoesqueleto, como estímulos fagocíticos o quimiotácticos.

Para determinar si el incremento en el nivel basal de F-actina inducido por IFN γ tiene un efecto sobre otra respuesta celular dependiente de la polimerización de actina, se evaluó la capacidad de polimerizar actina cuando la célula es estimulada con la quimiocina CCL5 (RANTES). En estos ensayos se observó que la capacidad de polimerizar actina en respuesta a CCL5 de los MDMs tratados con IFN γ fue menor que la de las células sin tratamiento (Fig. 12D). Como ya se había mencionado, los MDMs tratados con IFN γ tienen niveles basales de F-actina más altos que las células control (Fig 12C); en estas células el estímulo de CCL5 ya no indujo un aumento del nivel de F-actina (Fig. 12D). Estos resultados sugieren que una vez que se induce la polimerización de actina por el tratamiento con IFN γ , los MDMs no pueden responder eficientemente a estímulos adicionales que induzcan a la reorganización del citoesqueleto. En cuanto a IL-10, los niveles basales tras el tratamiento fueron los mismos que en las células sin tratar, y cuando se les estimuló con CCL5 los niveles de F-actina alcanzaron niveles aún más altos que en las células sin tratamiento después de la estimulación con CCL5 (Fig. 12D).

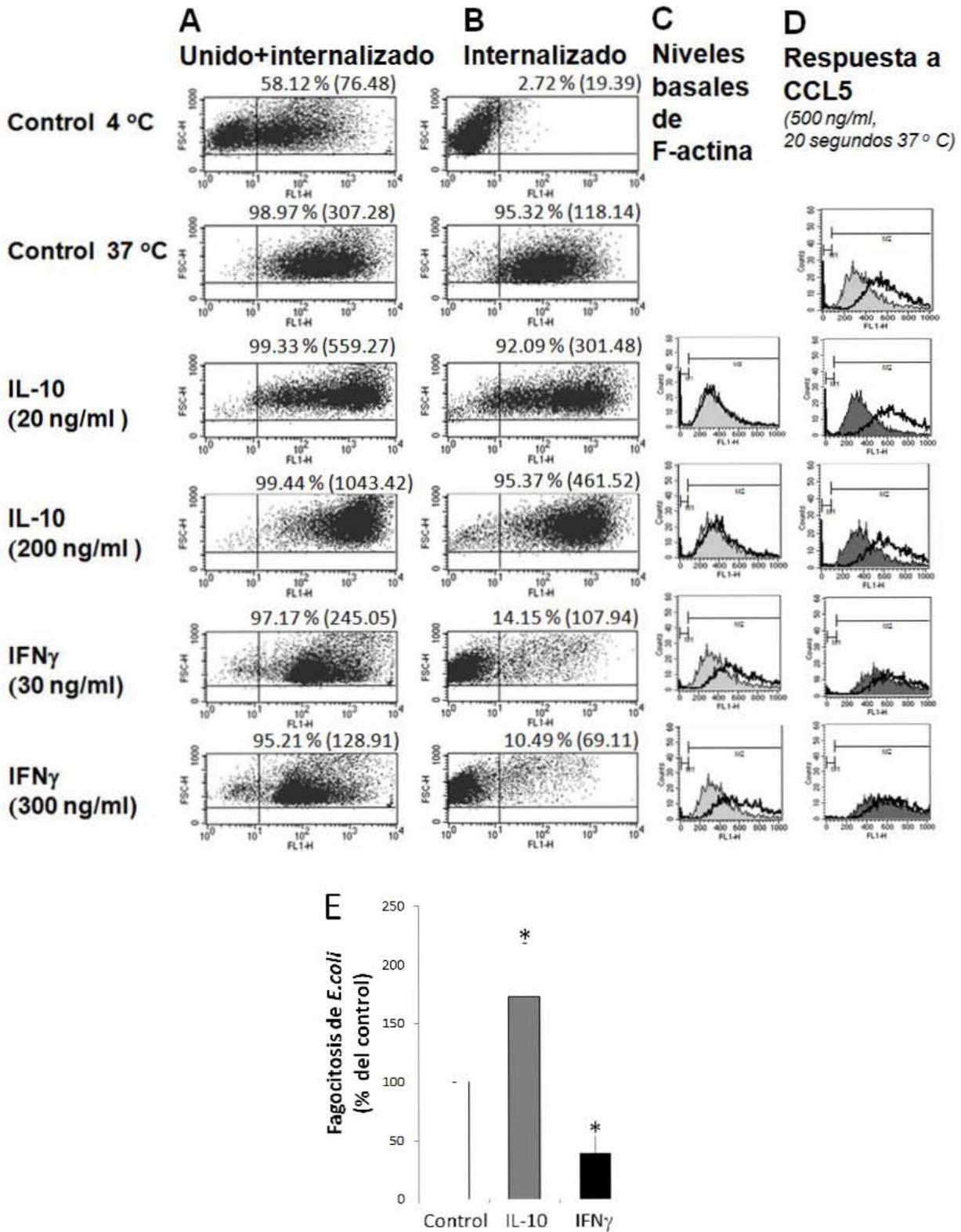


FIGURA 12. El IFN- γ inhibe la fagocitosis de *E.coli*, induce polimerización de actina y disminuye la capacidad de respuesta a CCL5, mientras que IL-10 aumenta la capacidad fagocítica sin inducir la polimerización de actina. Después de 48 h de tratamiento, los MDMs fueron incubados con *E.coli*-FITC por 20 min a 37°C (A y B) o teñidos con NBD-phalloidina (C y D). Tanto la fagocitosis como la tinción de F-

actina fueron evaluadas por citometría de flujo. Ver detalles en materiales y métodos. Los tratamientos para **A**, **B**, **C** y **D** se indican con los rótulos a la derecha. **A** muestra las bacterias tanto unidas como internalizadas. **B** muestra solo las bacterias internalizadas (captura de la muestra en presencia de azul tripán en el medio). Los porcentajes de células positivas y los valores de MGF se muestran arriba de cada grafica de puntos (dot plot) (**A** y **B**). Los niveles de F-actina se muestran en histogramas sobrelapados en **C**. (■) Células sin tratamiento. En **C** las líneas negras representan los basales de F-actina inducidos tras 48 h con cada tratamiento. Las respuestas a la estimulación con CCL5 son mostradas en **D**. Los niveles iniciales de F-actina dados por las 48 h con cada tratamiento (■) se presenta sobrelapado con la respuesta a CCL5 (líneas negras). **A**, **B**, **C**, y **D** son datos obtenidos de MDMs de un mismo donador. **E**. Índice fagocítico de *E.coli* en MDM tratados con IL-10 (20 ng/ml) o IFN γ (30 ng/ml). Se presenta el promedio de siete experimentos independientes. Las barras de error representan las desviaciones estándar. * = diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.05$ determinada usando la prueba de *t* Student pareada a dos colas. Se compararon controles contra tratamientos.

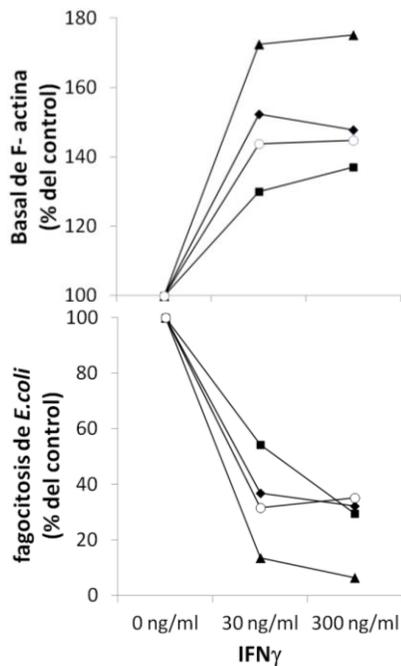


FIGURA 13. Correlación entre el nivel de F-actina y % de fagocitosis de *E.coli*. Cada donador fue representado con un mismo símbolo en ambos gráficos (▲, ◆, ○, ■). En el panel superior se presentan los % de F-actina y en el inferior los valores de % de fagocitosis correspondientes para cada uno de los donadores.

IFN γ induce activación de Rac1 pero no de Cdc42

La activación de Rac1 y Cdc42 está involucrada en la señalización que lleva a la polimerización de actina necesaria para la fagocitosis mediada por Fc γ Rs (Cox D. *et al.* 1997; May R. C. *et al.* 2001). Tomando en cuenta que hay un aumento en la cantidad de actina polimerizada en respuesta al tratamiento con IFN γ , decidimos evaluar el estado de activación de Rac1 y Cdc42 en células tratadas o no con IFN γ . Se realizaron ensayos de pull-down de las formas activas de Rac1 y Cdc42 a partir de lisados totales de MDM tratadas o sin tratar con IFN γ o IL-10, usando esferas de agarosa cubiertas con el motivo CRIB de PAK unido a GST (GST-PAK CRIB). El IFN γ induce activación de Rac1, cuyo nivel de activación es nulo en MDM control (Fig 14A), mientras que los niveles de Cdc42-

GTP entre células tratadas con IFN γ y sin tratar no fueron significativamente diferentes. El tratamiento con IL-10 no modificó los niveles de activación ni de Rac1 ni de Cdc42 (Fig. 14).

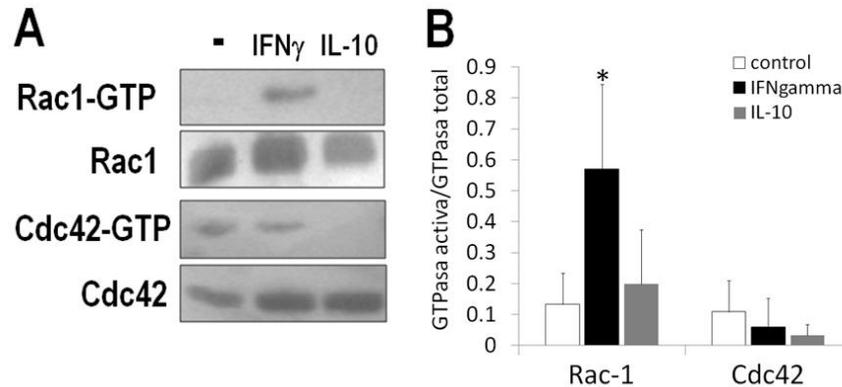


FIGURA 14. IFN γ induce la activación de Rac1 pero no la de Cdc42. Los MDMs fueron tratados o no con IFN γ (300 ng/ml) o IL-10 (20 ng/ml). Después de 48 h de tratamiento las células fueron lisadas y los ensayos de pull down de las formas activas de Rac1 y Cdc42 fueron realizados usando esferas de agarosa GST-Pak CRIB. A Las proteínas fueron separadas en geles SDS-PAGE. La presencia de Rac1 y Cdc42 fue determinada usando anticuerpos específicos. Los blots “Rac1-GTP” y “Cdc42-GTP” muestran los resultados de pull down, mientras que los blots de “Rac1” y “Cdc42” representan los resultados de los lisados totales. B. Los niveles de GTPasa activa fueron calculados como el cociente de la densidad óptica (O.D.) de la banda de Rac-GTP o Cdc42-GTP entre la O.D. de Rac1 o Cdc42 totales (Active GTPase/total GTPase). Los datos son presentados como el promedio de 4 experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar DS. *= diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.05$ fue determinado la prueba de t de Student pareada, comparando controles contra MDM tratadas

La inhibición de PI3K previene la polimerización de actina inducida por IFN γ

IFN γ induce polimerización de actina, pero se desconoce en mecanismo mediante el cual ocurre. Además de JAK/STAT, se han identificado otras vías de señalización que son activadas a través del IFN γ R después de la estimulación con IFN γ . Entre las proteínas de señalización que se han visto activadas tras la estimulación con IFN γ se encuentra PI3K (Nguyen H. et al. 2001; Gough D. J. et al. 2008; Hardy P. O. et al. 2009). Para determinar si PI3K está involucrada en la señalización iniciada por IFN γ que lleva a la polimerización de actina usamos LY294002, un inhibidor de PI3K. Con el objetivo de evitar la muerte celular inducida por el cultivo prolongado con LY294002 por 48 h, que ha sido el tiempo de cultivo con IFN γ usado en los experimentos anteriores, se analizó el efecto de tratar a los MDMs con IFN γ y/o LY294002 durante únicamente 12 y 20 h. Se determinó que 20 h de cultivo eran suficientes para observar la misma magnitud del efecto que se obtiene con 48 h de cultivo con IFN γ sobre la fagocitosis y la polimerización de actina, pero sin tener muerte celular inducida por LY294002. Aunque la morfología de los MDMs tratados con LY294002 comparada

con las células control (cultivadas con DMSO, vehículo donde se disolvió LY294002) fue distinta, el conteo celular usando azul tripán mostró que no había diferencias en el porcentaje de células vivas. Las células cultivadas por 12 ó 20 h con LY294002 no se pegaron a la caja y se observaban redondas, sin embargo el porcentaje de células vivas tanto en las células tratadas con DMSO como en las tratadas con IFN γ y/o LY294002 fue el mismo (95 %). Pevio a adicionar el IFN γ (30 ng/ml), los MDMs fueron incubados 40 min con LY294002 (50 μ M). Las células fueron teñidas con NBD-phallacidina después de 20 h de incubación con LY294002, IFN γ o ambas (LY294002+IFN γ). La tinción de F-actina mostró que el tratamiento con LY294002 no modifica los niveles basales de actina polimerizada (Fig 15 A y B). El nivel de F-actina en los MDMs tratados con LY294002 previo y durante el cultivo con IFN γ fue el mismo que en los MDMs control (Fig. 15). Estos resultados indican que la actividad de PI3K es necesaria para la que IFN γ induzca el aumento de la polimerización basal de actina que hemos observado.

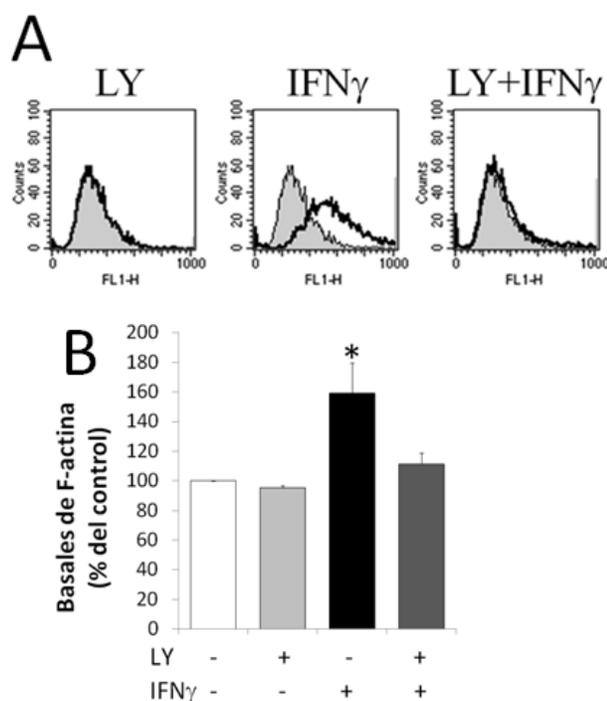


FIGURA 15. IFN γ requiere la actividad de PI3K para inducir polimerización de actina. MDMs fueron tratados por 20 h con DMSO (1.5 μ l), LY294002 (50 μ M) IFN γ (30 ng/ml) o LY294002+IFN γ . Después del tratamiento las células fueron teñidas con NBD-phallacidina y el contenido de F-actina fue evaluado por citometría de flujo. El nivel inicial de F-actina de las células tratadas con DMSO (histogramas sombreados) se muestra sobrelapado con los histogramas de cada tratamiento (línea negra). En **A** se muestra los histogramas de un experimento representativo de tres. Los porcentajes en **B** de F-actina fueron calculados considerando la media de fluorescencia de las células control como el 100 %. Se presenta el promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error representan las desviaciones estándar. * = diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.05$ determinada usando la prueba de t Student pareada a dos colas. Se compararon control contra tratamientos. Detalles en materiales y métodos.

VI. DISCUSIÓN

Aún cuando el efecto inhibitor de IFN γ y el activador de IL-10 sobre la fagocitosis mediada por Fc γ Rs han sido reportados antes (Ruegg S. J. *et al.* 1988; Schlesinger L. S. *et al.* 1991; Speert D. P. *et al.* 1991; Capsoni F. *et al.* 1995; Lingnau M. *et al.* 2007; Leidi M. *et al.* 2009), los mecanismos moleculares responsables de estos efectos no se conocen. En este trabajo se evaluaron eventos de la señalización relevantes en la vía que conduce a la fagocitosis mediada por Fc γ R en MDMs sin tratar y tratados con IFN γ o IL-10 para determinar la existencia de diferencias.

Como previamente se reportó, encontramos que el IFN γ regula positivamente la expresión del Fc γ RI (Fig. 9A) (te Velde A. A. *et al.* 1992; de Waal Malefyt R. *et al.* 1993; Capsoni F. *et al.* 1995; Wijngaarden S. *et al.* 2004). En este trabajo se determinó además que el IFN γ regula negativamente la expresión de la isoforma inhibitoria Fc γ RIIb, mientras que IL-10 induce aumentos en la expresión de todas las clases de Fc γ Rs (excepto Fc γ RIIa). Estos resultados nos indican que los efectos opuestos observados en la fagocitosis a través de Fc γ Rs no pueden ser atribuidos a los cambios inducidos por IFN γ e IL-10 sobre la expresión de estos receptores. En ambos tratamientos el balance en la expresión de receptores de activación/inhibición favorece a la activación, sin embargo sólo el aumento en la expresión inducido por IL-10 correlaciona con el incremento en la fagocitosis. En contraste, aunque IFN γ favorece el balance de la expresión de Fc γ Rs activadores, esta misma citocina induce la disminución significativa de la fagocitosis. ¿Cuál es la razón por la cual, aún cuando la célula expresa un mayor número de receptores, una de las funciones celulares mediadas por estos receptores, la fagocitosis, es regulada negativamente? Es posible que la señalización inducida por IFN γ modifique directamente la expresión y/o activación de alguno de los componentes involucrados en la señalización a través de los Fc γ Rs o bien que la señalización de IFN γ active moléculas que interfieran con la cascada de los Fc γ R teniendo repercusiones en respuestas celulares no solamente circunscritas a las estimuladas por los Fc γ Rs.

Aún cuando podría considerarse que el efecto positivo de IL-10 sobre la fagocitosis es debido al efecto positivo de esta citocina sobre la expresión de los Fc γ Rs, es posible también que el incremento en la fagocitosis mediada por los Fc γ R sea consecuencia de efectos adicionales de IL-10 sobre componentes de la señal. Por ejemplo, además del incremento en la expresión de los receptores, IL-10 podría estar aumentando el nivel de expresión de moléculas de señalización y/o induciendo el incremento de su actividad, cuyo resultado final sea potenciar la fagocitosis. Esta

hipótesis requiere ser probada en estudios posteriores, puesto que su abordaje escapa a los objetivos del presente trabajo.

Las respuestas bioquímicas tempranas mediadas por Fc γ Rs fueron afectadas de manera diferente por las citocinas. El efecto positivo de IL-10 en la fagocitosis y en los eventos tempranos en la señalización mediada por Fc γ Rs en MDMs, correlaciona con la regulación positiva de la expresión de todas las clases de los Fc γ Rs inducida por esta citocina. Por lo que respecta a IFN γ , la regulación negativa de la fagocitosis no fue acompañada por la supresión de los eventos bioquímicos tempranos desencadenados tras el entrecruzamiento de Fc γ Rs (Syk e incremento de [Ca²⁺]_i) como podría esperarse si se pensara que el IFN γ ejerce su efecto negativo a este nivel de la señalización. Sin embargo este resultado es congruente si se toman en cuenta otras funciones celulares mediadas por Fc γ Rs que cumple un macrófago activado con IFN γ , como lo es la producción y liberación de citocinas. Si los eventos más tempranos en la señalización de los Fc γ Rs estuviesen interrumpidos por la presencia del IFN γ no sólo la fagocitosis estaría disminuida, sino la producción de citocinas que caracteriza a los macrófagos M1 no se llevaría a cabo.

Las respuestas de elevación de [Ca²⁺]_i tras la agregación de los Fc γ Rs de los MDM tratados con IFN γ y las de los MDM control fueron muy similares. Tomando en cuenta el efecto de IL-10 en la expresión de Fc γ Rs, no es sorprendente que la elevación del [Ca²⁺]_i, una señal encendida tras el entrecruzamiento de los Fc γ R, estuviera también incrementada. Sin embargo, el IFN γ , que también induce el aumento en la expresión de los Fc γ R, no modificó la respuesta de calcio. La razón se desconoce, pero es posible que IFN γ active alguna molécula que regule negativamente la liberación de calcio, de modo tal que aún cuando se tiene una mayor expresión de Fc γ Rs y la activación de Syk es mayor, la liberación de calcio no sea mayor que la observada en MDMs sin tratamiento.

Reportes previos demuestran que el IFN γ induce la disminución de algunas respuestas dependientes del rearrreglo del citoesqueleto en monocitos y macrófagos. Ha sido publicado que monocitos cultivados en presencia de IFN γ muestran menor capacidad de internalizar bacterias y eritrocitos de carnero, ya sea sin opsonizar u opsonizados con C3b/C3bi o IgG (Ruegg S. J. *et al.* 1988; Schlesinger L. S. *et al.* 1991; Speert D. P. *et al.* 1991; Capsoni F. *et al.* 1994; Capsoni F. *et al.* 1995). Además del efecto en la fagocitosis, la migración de células mieloides tanto *in vivo* como *in vitro* está también afectada (Willenborg D. O. *et al.* 1996; Vermeire K. *et al.* 1997; Melrose J. *et al.* 1998; Robson R. L. *et al.* 2001; Wu X. *et al.* 2006; Hu Y. *et al.* 2008). Yang Hu y colaboradores publicaron evidencia del efecto inhibitor del IFN γ en la quimiotaxis de monocitos (Hu Y. *et al.*

2008). En sus ensayos, monocitos recién aislados no fueron capaces de migrar en respuesta a un gradiente de CCL2. Este grupo de investigadores evaluaron la vía de señalización involucrada en la polimerización de actina en busca de la razón por la cual IFN γ ejerce el efecto inhibitorio sobre la migración. En su estudio evaluaron los niveles de activación de Rac, Cdc42 y la polimerización de actina, entre otros eventos importantes tras la estimulación con CCL2. Encontraron que los niveles de activación de Rac y Cdc42 se incrementaron tras el tratamiento de los monocitos con IFN γ , pero en cuanto a la actina polimerizada no observaron diferencias significativas después del tratamiento. En este estudio encontramos que el nivel basal de F-actina es más alto después del tratamiento con IFN γ , y que los niveles de activación de Rac1 estaban incrementados también, sin cambios estadísticamente significativos en la activación de Cdc42. Las diferencias entre el trabajo de Yang Hu y el nuestro pudieran deberse a la cronicidad de la estimulación. Mientras ellos estimularon con IFN γ por 3 h, nosotros cultivamos a los MDM durante 48 h. Además ellos usan monocitos recién aislados, mientras nosotros realizamos los ensayos en MDMs de seis días de haber sido aislados y tras 48 h más de cultivo con IFN γ .

Tomando en cuenta nuestros resultados de fagocitosis de EIgG y *E.coli*, así como la repuesta de polimerización de actina a la estimulación con CCL5 en MDM tratados con IFN γ , además de las publicaciones en las que se demostró que las células monocíticas tratadas con IFN γ no pueden migrar en respuesta a quimiocinas (Hu Y. et al. 2008), nosotros proponemos que los efectos negativos del IFN γ sobre la migración y fagocitosis son debidos a la misma razón. Ambas funciones celulares requieren la reorganización del citoesqueleto, y ambos procesos involucran polimerización de actina. Es posible que cuando la F-actina es ensamblada en respuesta a IFN γ , la maquinaria necesaria para la reorganización del citoesqueleto se ocupe en dar respuesta a la señal del IFN γ . En este punto, las células tienen disminuida la capacidad de responder a señales adicionales que induzcan el rearrreglo del citoesqueleto debido a que los elementos requeridos para la polimerización de actina que hay disponibles no son suficientes para llevar a cabo la función celular a nivel óptimo. Por otro lado IL-10, que tiene un efecto positivo sobre la capacidad fagocítica, no afecta los niveles de F-actina de las células control, ni modifica los niveles de activación de Rac1 ni de Cdc42. Por lo tanto, tanto la actina como las moléculas involucradas en su polimerización se encuentran disponibles para relocalizarse y polimerizarse en el punto de contacto entre la partícula a fagocitar y el macrófago, o bien, puede iniciarse la polimerización de actina en respuesta al estímulo con CCL5. Se sabe que IL-10 induce el aumento en la expresión de CCR1 y CCR5 (Sozzani S. et al. 1998)

(receptores de CCL5) y de receptores fagocíticos (CD16, CD64, CD14, receptores scavenger) (Moore K. W. et al. 2001) de tal modo que teniendo la maquinaria celular disponible y un mayor número de receptores, la capacidad de responder a estímulos reconocidos por estos receptores se incrementa.

Quizá el IFN γ induce la polimerización de actina a través de una cascada de señalización independiente de la cascada de los Fc γ Rs. En condiciones de reposo, los MDM tratados con IFN γ no presentan cantidades detectables de Syk fosforilada. Es hasta que los Fc γ Rs son agregados que podemos detectar Syk fosforilada, no antes. Sin embargo, en MDM cultivados con IFN γ los niveles basales de F-actina son más altos que en las células no tratadas. Aún cuando es posible que el IFN γ induzca la polimerización de actina a través de una cascada de señalización independiente a la empleada por los Fc γ Rs, la señalización podría involucrar componentes comunes a la señalización a través de los Fc γ Rs. Proponemos que la señalización de IFN γ induce la polimerización de actina a través de una vía que involucra la activación de Rac1, ya que en monocitos previamente cultivados con IFN γ la activación basal de esta pequeña GTPasa se incrementó. La activación de Rac1 podría afectar las respuestas celulares que requieren remodelación del citoesqueleto de actina, como la capacidad de migrar y la fagocitosis, independientemente del receptor involucrado (Fig. 16). En células BHK, la expresión de Rac1 constitutivamente activa resultó en el incremento de los basales de F-actina, con respecto a las células que expresaban Rac1 silvestres (Moorman J. P. et al. 1999). Beemiller y colaboradores proponen que para la movilización de actina durante la fagocitosis, la célula requiere transitar repetidamente a través de un ciclo de activación-desactivación de las GTPasas pequeñas. Sugerimos que cuando la célula es estimulada con IFN γ la cascada involucrada en la polimerización de actina se activa. Mientras el IFN γ esté presente los MDM no pueden regresar completamente al estado inactivado, por lo tanto, en la célula no puede llevarse a cabo de manera normal el ciclo de activación-desactivación. Una vez que el citoesqueleto está reorganizado por la presencia del IFN γ , el resto de la maquinaria requerida para la polimerización de actina no es suficiente para relocalizarse y producir de manera eficiente F-actina en el sitio de contacto partícula-macrófago.

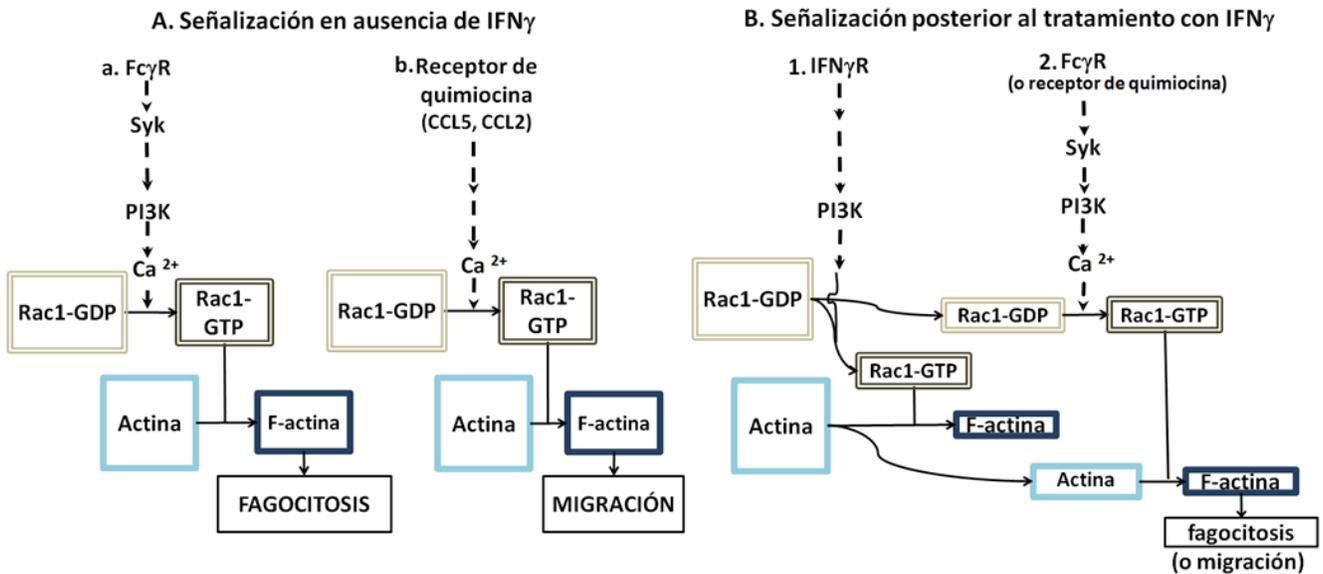


FIGURA 16. El efecto del tratamiento de IFN γ en la polimerización de actina afecta las respuestas del macrófago. A. Vía de señalización mediada por Fc γ R (a) o receptores quimiotácticos (b) en ausencia de IFN γ . El entrecruzamiento de los Fc γ R desencadena, entre otros eventos, la activación de Syk y PI3K, movilización de calcio, activación de Rac, y polimerización de actina (F-actina), todos eventos necesarios para la fagocitosis. Por otro lado, la señalización del receptor de quimiocina involucra, entre otros eventos de señalización, la activación de PI3K, movilización de calcio, activación de Rac y polimerización de actina, necesarios para la migración celular. B. El IFN γ induce, a través de una señal que involucra a PI3K, la activación de Rac y la polimerización de actina. La señal desencadenada por IFN γ afecta la reserva de moléculas como Rac y actina monomérica disponible para la polimerización de actina necesaria para la fagocitosis (y migración celular). Como resultado, la fagocitosis no se lleva a cabo de manera eficiente como ocurre en las células no tratadas con IFN γ . En la figura el tamaño de las cajas de Rac, actina, F-actina, fagocitosis y migración representan el tamaño de la reserva o de la respuesta en cada situación.

Otra posibilidad es la regulación heteróloga que pudiera ejercer el IFN γ sobre la señalización a través de los Fc γ R. Existen reportes de regulación heteróloga en la que receptores acoplados a ITAM, como son los Fc γ R y las β 2 integrinas, inhiben respuestas a través de TLRs y de receptores de interferón tipo I (IFNR-1) (Wang L. et al. 2010). La estimulación previa con complejos inmunes o fibrinógeno, ligandos de Fc γ R y de β 2 integrinas, respectivamente, suprimen la respuesta a IFN α , a LPS y a Pam3Cys, ligandos del receptor de interferón tipo I, TLR4 y TLR2 respectivamente. En su estudio, Lu Wang y colaboradores proponen que la inhibición de estas señales se debe a mecanismos indirectos mediados por la señal de β 2 integrinas o Fc γ R, que involucran la inducción de inhibidores de la señalización. Ellos encontraron que durante la inhibición se induce la expresión de proteínas como SOCS3, ABIN-3 y A20 que se sabe son supresores de las señales de TLRs y que

tiene la capacidad de llevar a cabo inhibición cruzada de otros receptores que utilicen TRAF6 (inhibido por A20), NF- κ B (inhibido por ABIN-3) o las JAK cinasas (inhibido por SOCS) (Wang L. et al. 2010). En este trabajo, a diferencia del de Lu Wang, de los eventos de señalización mediados por Fc γ R que fueron evaluados, no se encontró alguno suprimido posterior a la estimulación con IFN γ . Tanto la fosforilación de Syk, como el flujo de calcio se indujeron de manera eficiente tras la agregación de los Fc γ R en presencia de IFN γ . Aún cuando otros eventos de señalización, como la activación de Rac1 y Cdc42 entre otros, no fueron evaluados tras la agregación de los Fc γ Rs posterior al tratamiento con IFN γ , el hecho de que IFN γ induzca la polimerización de actina y la activación de Rac1 nos hacen pensar que la inhibición de la fagocitosis no es efecto de inhibición cruzada de la señalización de Fc γ Rs. Suponemos que de haber inhibición por regulación heteróloga observaríamos que los eventos de señalización necesarios para la fagocitosis como la polimerización de actina y la activación de GTPasas pequeñas no se llevarían a cabo. Consideramos que el IFN γ ejerce una regulación diferente a la que describen los modelos de regulación heteróloga puesto que en estos modelos las señales sujetas a inhibición no se inducen por la estimulación con el ligando del receptor que ejerce la regulación heteróloga, mientras en que en este caso algunas de eventos de señalización involucrados en la fagocitosis fueron activados por el IFN γ . Sin embargo, para determinar si IFN γ inhibe la activación de la señalización través de Fc γ Rs se requerirá evaluar la capacidad de activación de otros componentes de la cascada como Rac1 y Cdc42, factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), NF- κ B, etc., en repuesta al entrecruzamiento de Fc γ R después del cultivo previo de los MDMs con IFN γ .

Como ya se ha mencionado, además de la vía canónica de señalización a través de las proteínas JAK/STAT, se han identificado otras moléculas de señalización que son reclutadas tras la estimulación del IFN γ R con IFN γ . Estas proteínas incluyen, además de las GTPasas pequeñas, a cinasas de la familia Src, a PI3K, a moléculas adaptadoras y GEFs (Nguyen H. et al. 2001; Gough D. J. et al. 2008; Hardy P. O. et al. 2009). Es por ello que tratando de identificar alguno de los componentes de la señalización a través de la cual IFN γ polimeriza actina evaluamos el efecto de prescindir de la actividad de PI3K. Usando un inhibidor de PI3K, LY294002, demostramos que la actividad de PI3K se requiere para que el IFN γ induzca la polimerización de actina. En las células tratadas con LY294002 previamente y durante el cultivo con IFN γ , el IFN γ no indujo la polimerización de actina. Los basales de F-actina en células tratadas sólo con el vehículo del inhibidor fueron los mismos que las tratadas con LY294002+IFN γ . Esto indica que PI3K participa en

la señalización a través de la cual $\text{IFN}\gamma$ induce la polimerización de actina. El papel de otras moléculas involucradas en la polimerización de actina inducida por $\text{IFN}\gamma$ requerirá ser estudiada.

VIII. Conclusiones

Los efectos opuestos de IL-10 e IFN γ sobre la fagocitosis mediada por Fc γ Rs se deben a efectos diferentes de estas citocinas sobre la señalización que conduce a la fagocitosis mediada por Fc γ R en MDMs. La polimerización de actina y la activación de Rac1 inducida por IFN γ son parte de las diferencias en los mecanismos moleculares que median fagocitosis entre macrófagos tratados con IL-10 y los tratados con IFN γ .

Las señales tempranas desencadenadas tras la agregación de los Fc γ Rs en MDM tratados con IFN γ , como lo son la fosforilación de Syk y flujo de calcio, no están involucradas con el efecto negativo sobre la fagocitosis.

El tratamiento con IFN γ induce la polimerización de actina y activación de Rac1, lo que correlaciona con la disminución en la fagocitosis, ya sea de bacterias o de eritrocitos recubiertos con IgG, y una capacidad de respuesta disminuida ante CCL5. Lo que indica que el efecto de IFN γ no es receptor específico, es decir afecta las respuestas a estímulos adicionales que involucren el rearrreglo del citoesqueleto.

El caso de IL-10 es un caso distinto. IL-10 aumenta la expresión de los Fc γ Rs, lo que se trasciende en el aumento en la intensidad de la señal inducida tras la agregación de los Fc γ Rs, sin tener efecto sobre los basales de polimerización de actina. IL-10 induce que la célula tenga aumentada la expresión del receptor que media la fagocitosis, conservando el estado de activación celular a niveles bajos, con lo que la maquinaria celular se encuentra disponible para responder de manera eficiente al ser estimulada para rearrreglar el citoesqueleto, lo que genera una respuesta fagocítica no sólo eficiente, si no aumentada.

Perspectivas

Aunque quizá el efecto de IFN γ sobre la polimerización de actina explique el porqué de la mermada capacidad fagocítica, no se ha definido cómo IFN γ induce la producción de F-actina. Además de JAK/STAT, poco se conoce acerca de otras proteínas que son reclutadas tras la señal de IFN γ R después de la estimulación con IFN γ . No se sabe ni quiénes son, ni si contribuyen a la señal convencional de JAK/STAT o si inician vías alternas de señalización (Gough D. J. et al. 2008). Los potenciales candidatos, además de PI3K, son cinasas de la familia Src, moléculas adaptadoras, factores intercambiadores de guanidina (GEFs) y GTPasas (Rane S. G. *et al.* 2000; Gough D. J. *et al.* 2008). Se ha demostrado que Src, Lyn y Fyn se fosforilan de manera dependiente a Jak1 y Jak2 en respuesta a la señalización a través de IFN γ R, mientras que estudios de co-immunoprecipitation indican que PLC α o γ forman un complejo con JAK1/2 y c-Src/Lyn después de la estimulación con IFN γ . Por lo que el papel de estas moléculas en la vía de señalización que conduce a la polimerización de actina mediada por IFN γ R deberá determinarse.

En este trabajo se demostró que la actividad de PI3K es requerida para que IFN γ induzca la polimerización de actina, pero no se sabe si esta cinasa es reclutada de manera independiente o no a la señalización JAK/STAT. Con respecto a esto existe un reporte en el que se observó que el IFN γ activa PI3K en fibroblastos murinos deficientes de JAK1 o JAK2, tal y como ocurre en fibroblastos murinos silvestres (Nguyen H. et al. 2001). Aunque no fue descartado que otras JAK compensen la ausencia de JAK 1 ó 2, ese trabajo sugiere que PI3K podría ser activada por IFN γ de manera independiente a la activación de la señalización canónica a través del IFN γ R; pero esta hipótesis tendrá que ser evaluada.

BIBLIOGRAFÍA

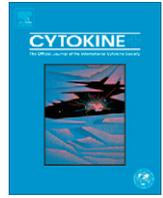
- Aderem, A. and D. M. Underhill** (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." *Annu Rev Immunol* **17**: 593-623.
- Auger, M. J. and J. A. Ross** (1992). *The biology of the macrophage*. The macrophage. C. E. Lewis and J. O. D. McGee. Oxford, Oxford University Press: 3-74.
- Axline, S. G. and E. P. Reaven** (1974). "Inhibition of phagocytosis and plasma membrane mobility of the cultivated macrophage by cytochalasin B. Role of subplasmalemmal microfilaments." *J Cell Biol* **62**(3): 647-659.
- Beemiller, P., Y. Zhang, et al.** (2010). "A Cdc42 activation cycle coordinated by PI 3-kinase during Fc receptor-mediated phagocytosis." *Mol Biol Cell* **21**(3): 470-480.
- Billiau, A.** (2006). "Interferon: the pathways of discovery I. Molecular and cellular aspects." *Cytokine Growth Factor Rev* **17**(5): 381-409.
- Boehm, U., T. Klamp, et al.** (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." *Annu Rev Immunol* **15**: 749-795.
- Bogdan, C.** (2006). *Macrophages*. Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons.
- Boross, P., K. van de Poel, et al.** (2008). *Fc Receptors*. ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. J. W. Sons.
- Buchwald, U. K., H. F. Geerdes-Fenge, et al.** (1999). "Interleukin-10: effects on phagocytosis and adhesion molecule expression of granulocytes and monocytes in a comparison with prednisolone." *Eur J Med Res* **4**(3): 85-94.
- Capsoni, F., F. Minonzio, et al.** (1994). "Fc receptors expression and function in mononuclear phagocytes from AIDS patients: modulation by IFN-gamma." *Scand J Immunol* **39**(1): 45-50.
- Capsoni, F., F. Minonzio, et al.** (1995). "IL-10 up-regulates human monocyte phagocytosis in the presence of IL-4 and IFN-gamma." *J Leukoc Biol* **58**(3): 351-358.
- Cory, G. O., R. Garg, et al.** (2002). "Phosphorylation of tyrosine 291 enhances the ability of WASp to stimulate actin polymerization and filopodium formation. Wiskott-Aldrich Syndrome protein." *J Biol Chem* **277**(47): 45115-45121.
- Cory, G. O. and A. J. Ridley** (2002). "Cell motility: braking WAVES." *Nature* **418**(6899): 732-733.
- Cox, D., P. Chang, et al.** (1997). "Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes." *J Exp Med* **186**(9): 1487-1494.
- Cox, D., C. C. Tseng, et al.** (1999). "A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension." *J Biol Chem* **274**(3): 1240-1247.
- Crowley, M. T., P. S. Costello, et al.** (1997). "A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc gamma receptors on macrophages." *J Exp Med* **186**(7): 1027-1039.
- Daeron, M.** (1997). "Fc receptor biology." *Annu Rev Immunol* **15**: 203-234.
- Daeron, M. and R. Lesourne** (2006). "Negative signaling in Fc receptor complexes." *Adv Immunol* **89**: 39-86.
- de Waal Malefyt, R., C. G. Figdor, et al.** (1993). "Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10." *J Immunol* **151**(11): 6370-6381.
- Di Virgilio, F., B. C. Meyer, et al.** (1988). "Fc receptor-mediated phagocytosis occurs in macrophages at exceedingly low cytosolic Ca²⁺ levels." *J Cell Biol* **106**(3): 657-666.
- Ernst, L. K., A. M. Duchemin, et al.** (1993). "Association of the high-affinity receptor for IgG (Fc gamma RI) with the gamma subunit of the IgE receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(13): 6023-6027.

- Fertsch, D. and S. N. Vogel** (1984). "Recombinant interferons increase macrophage Fc receptor capacity." *J Immunol* **132**(5): 2436-2439.
- Geissmann, F., M. G. Manz, et al.** (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." *Science* **327**(5966): 656-661.
- Gordon, S. and P. R. Taylor** (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." *Nat Rev Immunol* **5**(12): 953-964.
- Gough, D. J., D. E. Levy, et al.** (2008). "IFNgamma signaling-does it mean JAK-STAT?" *Cytokine Growth Factor Rev* **19**(5-6): 383-394.
- Greenberg, S.** (2001). "Diversity in phagocytic signalling." *J Cell Sci* **114**(Pt 6): 1039-1040.
- Greenberg, S., J. el Khoury, et al.** (1991). "Ca(2+)-independent F-actin assembly and disassembly during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages." *J Cell Biol* **113**(4): 757-767.
- Groves, E., A. E. Dart, et al.** (2008). "Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells." *Cell Mol Life Sci* **65**(13): 1957-1976.
- Hardy, P. O., T. O. Diallo, et al.** (2009). "Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in the regulation of protein kinase C-alpha activation in interferon-gamma-stimulated macrophages." *Immunology* **128**(1 Suppl): e652-660.
- Heasman, S. J. and A. J. Ridley** (2008). "Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(9): 690-701.
- Hu, Y., X. Hu, et al.** (2008). "IFN-gamma and STAT1 arrest monocyte migration and modulate RAC/CDC42 pathways." *J Immunol* **180**(12): 8057-8065.
- Isaacs, A. and J. Lindenmann** (1957). "Virus interference. I. The interferon." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**(927): 258-267.
- Johnson, H. M., B. A. Torres, et al.** (2005). *Interferons*. Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons.
- Jungi, T. W.** (1985). "A rapid and sensitive method allowing photometric determination of erythrophagocytosis by mononuclear phagocytes." *J Immunol Methods* **82**(1): 141-153.
- Jungi, T. W., P. G. Lerch, et al.** (1987). "The effect of recombinant interferon-gamma on human monocyte-derived macrophages." *Eur J Immunol* **17**(5): 735-738.
- Jungi, T. W., S. J. Rugg, et al.** (1989). "Interferon gamma-treated human macrophages display enhanced cytolysis and generation of reactive oxygen metabolites but reduced ingestion upon Fc receptor triggering." *Hum Immunol* **24**(2): 77-93.
- Keler, T., P. K. Wallace, et al.** (2000). "Differential effect of cytokine treatment on Fc alpha receptor I- and Fc gamma receptor I-mediated tumor cytotoxicity by monocyte-derived macrophages." *J Immunol* **164**(11): 5746-5752.
- Kiefer, F., J. Brumell, et al.** (1998). "The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc gamma receptor signaling in macrophages and neutrophils." *Mol Cell Biol* **18**(7): 4209-4220.
- Larsen, E. C., J. A. DiGennaro, et al.** (2000). "Differential requirement for classic and novel PKC isoforms in respiratory burst and phagocytosis in RAW 264.7 cells." *J Immunol* **165**(5): 2809-2817.
- Leidi, M., E. Gotti, et al.** (2009). "M2 macrophages phagocytose rituximab-opsonized leukemic targets more efficiently than m1 cells in vitro." *J Immunol* **182**(7): 4415-4422.
- Li, X., T. S. Ptacek, et al.** (2009). "Fc gamma receptors: structure, function and role as genetic risk factors in SLE." *Genes Immun* **10**(5): 380-389.
- Lingnau, M., C. Hoflich, et al.** (2007). "Interleukin-10 enhances the CD14-dependent phagocytosis of bacteria and apoptotic cells by human monocytes." *Hum Immunol* **68**(9): 730-738.

- Liu, Y., E. Masuda, et al.** (2005). "Cytokine-mediated regulation of activating and inhibitory Fc gamma receptors in human monocytes." *J Leukoc Biol* **77**(5): 767-776.
- Mantovani, A., A. Sica, et al.** (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." *Trends Immunol* **25**(12): 677-686.
- Martinez, F. O., A. Sica, et al.** (2008). "Macrophage activation and polarization." *Front Biosci* **13**: 453-461.
- Masuda, M., A. J. Verhoeven, et al.** (1993). "Tyrosine phosphorylation of a gamma-chain homodimer associated with Fc gamma RIII (CD16) in cultured human monocytes." *J Immunol* **151**(11): 6382-6388.
- May, R. C. and L. M. Machesky** (2001). "Phagocytosis and the actin cytoskeleton." *J Cell Sci* **114**(Pt 6): 1061-1077.
- Melrose, J., N. Tsurushita, et al.** (1998). "IFN-gamma inhibits activation-induced expression of E- and P-selectin on endothelial cells." *J Immunol* **161**(5): 2457-2464.
- Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, et al.** (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." *Annu Rev Immunol* **19**: 683-765.
- Moorman, J. P., D. Luu, et al.** (1999). "A balance of signaling by Rho family small GTPases RhoA, Rac1 and Cdc42 coordinates cytoskeletal morphology but not cell survival." *Oncogene* **18**(1): 47-57.
- Morinobu, A., S. Kumagai, et al.** (1996). "IL-10 suppresses cell surface CD23/Fc epsilon RII expression, not by enhancing soluble CD23 release, but by reducing CD23 mRNA expression in human monocytes." *J Clin Immunol* **16**(6): 326-333.
- Nguyen, H., C. V. Ramana, et al.** (2001). "Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon-gamma-dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression." *J Biol Chem* **276**(36): 33361-33368.
- Nimmerjahn, F.** (2006). "Activating and inhibitory Fc gamma Rs in autoimmune disorders." *Springer Semin Immunopathol* **28**(4): 305-319.
- Nimmerjahn, F., P. Bruhns, et al.** (2005). "Fc gamma RIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity." *Immunity* **23**(1): 41-51.
- Nimmerjahn, F. and J. V. Ravetch** (2008). "Fc gamma receptors as regulators of immune responses." *Nat Rev Immunol* **8**(1): 34-47.
- Noel, B. L., S. Lilo, et al.** (2009). "Yersinia pestis can bypass protective antibodies to LcrV and activation with gamma interferon to survive and induce apoptosis in murine macrophages." *Clin Vaccine Immunol* **16**(10): 1457-1466.
- Nunes, P. and N. Demarex** (2010). "The role of calcium signaling in phagocytosis." *J Leukoc Biol* **88**(1): 57-68.
- Olson, E. N. and A. Nordheim** (2010). "Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(5): 353-365.
- Quan, Y., T. Moller, et al.** (2009). "Regulation of Fc gamma receptors and immunoglobulin G-mediated phagocytosis in mouse microglia." *Neurosci Lett* **464**(1): 29-33.
- Rane, S. G. and E. P. Reddy** (2000). "Janus kinases: components of multiple signaling pathways." *Oncogene* **19**(49): 5662-5679.
- Robson, R. L., R. M. McLoughlin, et al.** (2001). "Differential regulation of chemokine production in human peritoneal mesothelial cells: IFN-gamma controls neutrophil migration across the mesothelium in vitro and in vivo." *J Immunol* **167**(2): 1028-1038.
- Ruegg, S. J. and T. W. Jungi** (1988). "Antibody-mediated erythrololysis and erythrophagocytosis by human monocytes, macrophages and activated macrophages. Evidence for distinction

- between involvement of high-affinity and low-affinity receptors for IgG by using different erythroid target cells." *Immunology* **63**(3): 513-520.
- Saarikangas, J., H. Zhao, et al.** (2010). "Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides." *Physiol Rev* **90**(1): 259-289.
- Sabat, R.** (2010). "IL-10 family of cytokines." *Cytokine Growth Factor Rev* **21**(5): 315-324.
- Sabat, R., G. Grutz, et al.** (2010). "Biology of interleukin-10." *Cytokine Growth Factor Rev* **21**(5): 331-344.
- Sada, K., T. Takano, et al.** (2001). "Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase." *J Biochem* **130**(2): 177-186.
- Savan, R., S. Ravichandran, et al.** (2009). "Structural conservation of interferon gamma among vertebrates." *Cytokine Growth Factor Rev* **20**(2): 115-124.
- Schlesinger, L. S. and M. A. Horwitz** (1991). "Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN-gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium." *J Immunol* **147**(6): 1983-1994.
- Schoenborn, J. R. and C. B. Wilson** (2007). "Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses." *Adv Immunol* **96**: 41-101.
- Schroder, K., P. J. Hertzog, et al.** (2004). "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." *J Leukoc Biol* **75**(2): 163-189.
- Sly, L. M., V. Ho, et al.** (2007). "The role of SHIP in macrophages." *Front Biosci* **12**: 2836-2848.
- Sozzani, S., S. Ghezzi, et al.** (1998). "Interleukin 10 increases CCR5 expression and HIV infection in human monocytes." *J Exp Med* **187**(3): 439-444.
- Speert, D. P. and L. Thorson** (1991). "Suppression by human recombinant gamma interferon of in vitro macrophage nonopsonic and opsonic phagocytosis and killing." *Infect Immun* **59**(6): 1893-1898.
- Spittler, A., C. Schiller, et al.** (1995). "IL-10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4-driven CD23 expression on cultured human blood monocytes: effects of IL-10 and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis." *Immunology* **85**(2): 311-317.
- Swanson, J. A.** (2008). "Shaping cups into phagosomes and macropinosomes." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(8): 639-649.
- te Velde, A. A., R. de Waal Malefijt, et al.** (1992). "IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10." *J Immunol* **149**(12): 4048-4052.
- Van Vugt, M. J. and J. G. Van de Winkel** (2001). *Fc Receptors*. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES* J. W. Sons.
- Vermeire, K., H. Heremans, et al.** (1997). "Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice." *J Immunol* **158**(11): 5507-5513.
- Wang, L., R. A. Gordon, et al.** (2010). "Indirect inhibition of Toll-like receptor and type I interferon responses by ITAM-coupled receptors and integrins." *Immunity* **32**(4): 518-530.
- Wijngaarden, S., J. G. van de Winkel, et al.** (2004). "A shift in the balance of inhibitory and activating Fc gamma receptors on monocytes toward the inhibitory Fc gamma receptor IIb is associated with prevention of monocyte activation in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* **50**(12): 3878-3887.
- Willenborg, D. O., S. Fordham, et al.** (1996). "IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **157**(8): 3223-3227.

- Wu, X., W. Hou, et al.** (2006). "Novel function of IFN-gamma: negative regulation of dendritic cell migration and T cell priming." *J Immunol* **177**(2): 934-943.
- Zigmond, S. H. and J. G. Hirsch** (1972). "Effects of cytochalasin B on polymorphonuclear leucocyte locomotion, phagocytosis and glycolysis." *Exp Cell Res* **73**(2): 383-393.



Interferon gamma induces actin polymerization, Rac1 activation and down regulates phagocytosis in human monocytic cells

Dulce Frausto-Del-Río^a, Isabel Soto-Cruz^b, Claudia Garay-Canales^a, Xochitl Ambriz^a, Gloria Soldevila^a, Jorge Carretero-Ortega^c, José Vázquez-Prado^c, Enrique Ortega^{a,*}

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

^b Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer L-4 PB, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Guelatao No. 66 Col. Ejército de Oriente, Iztapalapa, D.F. 09230, Mexico

^c Department of Pharmacology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), Ap. Postal 14-740, D.F. 07000, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 June 2011

Received in revised form 28 October 2011

Accepted 4 November 2011

Available online 1 December 2011

Keywords:

IgG receptors

Macrophages

F-actin

Cytoskeleton

Phagocytosis

PI3K

ABSTRACT

IFN γ is a potent activator and IL-10 a powerful inhibitor of macrophage functions. However, neither all cellular functions are enhanced by IFN γ nor IL-10 inhibits all cellular responses. Thus, Fc γ R-mediated phagocytosis in monocyte-derived macrophages (MDM) increases after IL-10 treatment, and decreases after treatment with IFN γ , although both IL-10 and IFN γ up regulate Fc γ RI expression. In this work we investigated the effect of IFN γ and IL-10 on phagocytic signaling by Fc γ Rs in MDM. Treatment with IFN γ diminished phagocytosis of IgG-opsonized SRBC (IgG-SRBC) while treatment with IL-10 increased it. These opposite effects cannot be attributed to changes in Fc γ R expression induced by each cytokine. Early biochemical responses mediated by Fc γ Rs were distinctly affected by cytokine treatment. Syk phosphorylation and the rise in [Ca²⁺]_i were higher after IL-10 treatment, whereas IFN γ treatment also increased Syk phosphorylation but had no effect on the rise in [Ca²⁺]_i. IFN γ treatment led to increased basal levels of F-actin and this effect correlated with the decrease in phagocytosis of both IgG-SRBC and non-opsonized *Escherichia coli*. IL-10 did not alter F-actin basal levels, and enhanced the phagocytosis of *E. coli* and IgG-SRBC. The level of F-actin reached after IFN γ treatment was not further increased after stimulation with IgG-SRBC or CCL5, whereas MDM treated with IL-10 showed a slightly higher response than control cells to CCL5. IFN γ increased Rac1-GTP levels. Inhibition of PI3K with LY294002 prevented IFN γ -mediated actin polymerization. Our data suggest that IFN γ induces a higher basal level of F-actin and activation of Rac1, affecting the response to stimuli that induce cytoskeleton rearrangement such as phagocytic or chemotactic stimuli.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cells of the monocyte–macrophage lineage can display a wide range of functional heterogeneity that is shaped by cytokines and/or microbial components in their environment. IFN γ is generally considered as a potent activator of macrophages and monocytes while IL-10 is considered a powerful inhibitor. IFN γ enhances

several macrophage responses such as microbial killing, antigen presentation, and production of inflammatory mediators [1,2], and these same functions are down regulated by IL-10. However, neither all cellular functions are enhanced by IFN γ nor IL-10 inhibits all cellular responses. Thus, for instance, IFN γ can diminish monocyte/macrophage phagocytosis of bacteria and sheep red blood cells (SRBC), unopsonized or opsonized with IgG or C3b/C3bi [3–7]. In contrast, IL-10 enhances phagocytosis of IgG-SRBC [6,8], B cells covered with Rituximab (IgG1) [9], *Escherichia coli* and apoptotic cells [10].

Phagocytosis is a distinctive function of monocytes and macrophages, which is important for host defense and homeostasis. In these cells, phagocytosis is mediated by a wide repertoire of phagocytic receptors, including receptors for IgG antibodies (Fc γ Rs). Binding of IgG-opsonized particles induces crosslinking of Fc γ Rs, triggering Src-mediated phosphorylation of the ITAM motifs of the receptor [11]. The phosphorylated ITAMs are docking sites

Abbreviations: DBA, 3,3'-diaminobenzidine; FBS, fetal bovine serum; Fc γ R, receptor for the Fc portion of IgG; GMF, geometric mean of fluorescence intensity; HRP, horseradish peroxidase; IgG-SRBC, IgG-opsonized sheep red blood cells; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; mAb, monoclonal antibody; MDM, monocyte derived macrophages; MFI, mean fluorescence intensity; NBD-phalloidin, N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)phalloidin; PFA, paraformaldehyde; SRBC, sheep red blood cells; TNBS, 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid; TNBS-SRBC, TNBS sensitized sheep red blood cells.

* Corresponding author. Tel.: +52 56 22 38 34.

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

for Syk, whose binding induces its phosphorylation and activation. The local concentration of active Syk increases at the contact site of the macrophage with the opsonized particle, triggering downstream signaling [12]. Events downstream of Syk include phosphorylation and activation of PI3K, PLC γ , PKC, activation of GEFs, activation of small GTPases such as Cdc42 and Rac, assembly of Arp2/3 complexes and actin polymerization, all of them required for phagocytosis. For particle internalization, coordinated changes in cytoskeleton during pseudopod extension are required, including an increase in F-actin concentration at the advancing edge [13].

Both IL-10 and IFN γ up regulate Fc γ RI expression on human monocyte derived macrophages (MDM), but nevertheless Fc γ R-mediated phagocytosis is increased after treatment with IL-10 whereas IFN γ significantly diminishes phagocytic capacity [6,9,14–16]. To date, the mechanisms by which IL-10 enhances and IFN γ down regulates phagocytosis are not known. In this study we investigated the effect of IFN γ and IL-10 on phagocytic signaling mediated by Fc γ Rs in monocytic cells. The positive effect of IL-10 on phagocytosis and on signaling mediated by Fc γ Rs correlated with the up regulation of Fc γ Rs expression induced by IL-10 in MDM. The inhibition of phagocytosis induced by IFN γ was not accompanied by suppression of the early biochemical events triggered by Fc γ Rs crosslinking. Instead, IFN γ induced a higher basal level of F-actin and activation of Rac1, which might be involved in the reduced phagocytic capacity of IFN γ -treated cells. Inhibition of PI3K prevented the increase in F-actin induced by IFN γ . We propose that F-actin assembling in response to IFN γ engages a portion of the components necessary for cytoskeleton reorganization, leading to impaired responses requiring cytoskeleton rearrangement.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and antibodies

Fetal bovine serum (FBS), RPMI 1640 medium, MEM Sodium pyruvate solution, MEM non-essential amino acids solution and Protein A-agarose beads were purchased from GIBCO Laboratories (Grand Island, NY). Bovine serum albumin (BSA), 3,3'-diaminobenzidine (DBA) and Endotoxin kit timed gel formation were from Sigma (St. Louis, MO). 2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) and X-ray films (Scientific imaging film) were from Eastman Kodak Co. (Rochester, NY). Murine monoclonal IgG1 anti-human Fc γ RI (32.2) and murine monoclonal IgG2a anti-human Fc γ RII (IV.3) mAbs were purified in our laboratory from supernatants of the corresponding hybridomas obtained from ATCC. Fab fragments were prepared from the purified antibodies with Immobilized Pepsin (Pierce), following the manufacturer's instructions. Murine monoclonal anti-human Fc γ RIIIA (3G8, anti-CD16 FITC) was from Beckman Coulter (San Diego, CA). Murine monoclonal anti-DNP-specific antibody 4F8 (IgG2b) was produced in our laboratory from culture supernatants of the corresponding hybridomas. Mouse IgG1 and IgG2 isotype controls were from CALTAG Invitrogen (Carlsbad, CA). Goat polyclonal IgG anti-human Fc γ RIIIa (CD32-A), anti-Fc γ RIIIb (CD32-B), anti-Syk (N-19, rabbit polyclonal IgG), anti-phosphotyrosine antibodies (PY-20-HRP) and anti-Syk coated beads (rabbit polyclonal IgG anti-Syk) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Perm/Wash solution for intracellular staining was purchased from BD Biosciences (San Diego, CA). Goat anti-rabbit IgG F(ab) $'_2$, HRP-goat anti-mouse IgG(H+L) conjugate and rabbit anti-goat IgG (H+L)-FITC were from Zymed (San Francisco, CA). Recombinant human IFN γ (rh-IFN γ) was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN) and PeproTech (Rocky Hill, NJ). N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) phalloidin (NBD-phalloidin), Vibrant Phagocytosis Assay Kit Invitrogen V6694, containing *E. coli* (K-12 strain) fluorescein conjugated Bio particles and

HRP goat anti-mouse were from Invitrogen (Eugene, OR). Fluo-3 AM and Fura Red AM were from Molecular Probes (Eugene, OR). LY294002 was from CALBIOCHEM (La Jolla, CA). Mouse monoclonal antibodies against Rac1 were from BD Transduction Laboratories (San Diego, CA), rabbit polyclonal anti-Cdc42 antibody was from New East Biosciences (Malvern, PA), and goat anti-rabbit antibody-HRP was from KPL (Gaithersburg, MD).

2.2. Human monocyte purification and culture

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation from buffy coats from healthy donors obtained from the Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS Blood Center, using Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Sweden). Mononuclear cells were washed four times with PBS pH 7.5, and cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated autologous plasma-derived serum, 1 mM MEM Sodium pyruvate solution, 2 mM MEM non-essential amino acids solution, 0.1 mM of L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin, for 30 min at 37 °C, to allow monocytes adherence to plastic. Non adherent cells were eliminated by several washes. Adherent cells, considered enriched monocytes (>90% purity as determined by flow cytometry using CD14 as marker), were cultured for 6 days in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FBS in a humidified atmosphere at 37 °C with 5% CO $_2$. The resulting MDM were harvested by mechanical scrapping, adjusted to 0.5×10^6 cells/mL and cultured for 48 h without cytokines or with IFN γ (30 ng/mL) or IL-10 (20 ng/mL). The MDM and MDM treated with IFN γ or IL-10 were tested for endotoxin (<0.004 ng/ml). For phagocytosis assays the cells were seeded in 96 well plates. For determinations of Fc γ R expression, calcium rise, Syk phosphorylation and Rac1 activation the MDM were seeded in 100 mm cell culture dishes, and for F-actin staining in six-well plates.

2.3. Determination of Fc γ Rs expression and F-actin level by flow cytometry

MDM suspensions (3×10^5 cells) were incubated in PBS pH 7.5 with 5% FBS and 0.01% sodium azide and 10 μ g/mL of murine monoclonal anti-Fc γ RI (32.2) or anti-Fc γ RII (IV.3) antibodies for 60 min at 4 °C. After washing, cells were incubated in the dark for 30 min with 0.45 μ g/mL FITC-labeled goat anti-mouse IgG. Expression of Fc γ RIIIA was determined by direct labeling with anti-CD16 FITC. After washing, the cells were fixed for 30 min in 1% paraformaldehyde and resuspended in PBS.

For intracellular staining of Fc γ RIIIa and Fc γ RIIIb, MDM suspensions (1×10^6 cells) were incubated in PFA 4% in PBS pH 7.5 for 10 min at 4 °C. The cells were washed twice with PBS, and incubated 15 min in 1 \times Perm/Wash solution at 4 °C. After washing with Perm/Wash solution, cells were incubated with anti-Fc γ RIIIa (CD32A) or Fc γ RIIIb (CD32B) (1:200) for 30 min at 4 °C, and washed twice with Perm/Wash solution. Non-specific binding was blocked by incubation for 30 min at 4 °C with Beriglobina P (pooled human immunoglobulin from healthy donors, CSL Behring, Mexico City) diluted 1:150. After washing, cells were incubated for 30 min in the dark with secondary rabbit anti-goat IgG FITC (diluted 1:600). After washing twice with Perm/Wash solution and once with PBS, cells were resuspended in PFA 1% and immediately analyzed by flow cytometry.

F-actin was measured using NBD-phalloidin. MDM (1×10^6 in 200 μ l) non-treated or treated with IFN γ or IL-10, were stimulated or not for 20 s with CCL5 (50 ng/mL). For some experiments, MDM were incubated with IgG-opsonized or non opsonized SRBCs for 25 min at 4 °C to promote contact between MDM and SRBCs, and stimulation was allowed to proceed for 3 min at 37 °C. Stimulation

was stopped by transferring 40 μ l of cell suspension to 40 μ l of 7.5 % formaldehyde and incubated for 1 h at room temperature in the dark. Cells were then simultaneously permeabilized and stained with 40 μ l of a solution of 0.2 mg/mL of lysophosphatidyl choline and 20 units of NBD-phalloidin dissolved in PBS. The cells were incubated at room temperature for 1 h in the dark. Stained cells were analyzed in a FACscan cytometer with CellQuest software (Becton Dickinson).

2.4. Cell stimulation and immunoprecipitation

MDM cell suspensions (3×10^6 cells/mL) were maintained in serum-free RPMI-1640 medium for 10 min on ice and incubated with 10 μ g/mL of mouse anti-Fc γ RI (32.2) or anti-Fc γ RII (IV.3) mAb, for 10 min on ice. After washing to eliminate non bound antibodies, 10 μ g/mL of F(ab) $_2$ fragments of goat anti-mouse IgG were added to induce Fc γ R aggregation. The cells were then incubated 3 min at 37 °C. Stimulation was stopped by addition of 500 μ l of ice-cold PBS and the cells were collected by centrifugation at 4 °C. The supernatant was discarded and the cells were lysed in 400 μ l of lysis buffer containing proteases and phosphatases inhibitors (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM Na $_3$ VO $_4$, 1 mM phenyl-methyl sulfonyl fluoride, 10 mM NaF and 1 mg/mL of pepstatin A, leupeptin and aprotinin) and kept on ice for 15 min. Lysates were clarified by centrifugation at 14,000 rpm for 15 min at 4 °C. For immunoprecipitation, the lysates were incubated for 3 h at 4 °C with anti-Syk antibodies bound to protein A-agarose beads (Santa Cruz). Immunoprecipitates were washed five times with lysis buffer and once with water plus protease and phosphatase inhibitors. Then, the beads were boiled in Laemmli's sample buffer and separated in 10 % SDS-PAGE gels for immunoblotting.

2.5. Immunoblotting

Immunoprecipitates or whole cell lysates were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 3% BSA in Tween-20-Tris-buffered saline (T-TBS) (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1% Tween-20) overnight at 4 °C. This was followed by incubation with HRP-conjugated anti-phosphotyrosine antibody (HRP PY-20) for 1.5 h at room temperature. For chemiluminiscent detection, blots were treated with Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, USA) according to the manufacturer's instructions, and exposed to X-ray films. Digitalized images of the developed films used to capture the chemiluminiscent signals were obtained with the Gel-Doc 2000 System (Bio-Rad) and analyzed with the Bio-Rad Quantity One software. Where indicated, membranes were stripped and reblotted with a different combination of primary and secondary antibodies. For stripping, membranes were incubated in 0.1 M glycine (pH 2.5) for 1.5 h at 60 °C. After washing, the membranes were blocked and incubated with primary (rabbit anti-Syk) antibody in T-TBS with 3% BSA for 1.5 h at room temperature. Washed membranes were then incubated with a secondary antibody (HRP goat anti-rabbit IgG) in T-TBS with 3% BSA for 1 h at room temperature and processed as described above for signal development and image capture.

2.6. Phagocytosis mediated by Fc γ Rs

SRBCs were kept at 4 °C in Alsever's solution for a maximum of 1 week. They were washed twice in DGVB $^{2+}$ sterile buffer (2.5 mM Veronal, 75 mM NaCl, 2.5% dextrose, 0.05% gelatin, 0.15 mM CaCl $_2$, 0.5 mM MgCl $_2$, pH 7.5) and sensitized with TNBS by incubating 1.0 mL of packed SRBC with 1.55 mg of TNBS in 7 mL of borate buffer pH 8.5 with gentle shaking and protected

from light for 10 min at 4 °C. The sensitized SRBC were washed with DGVB $^{2+}$ and then with RPMI medium without FBS. Opsonization of SRBC with anti-DNP IgG was carried out by incubating a 1% suspension of sensitized SRBC in RPMI with a sub-hemagglutinating dilution of anti-DNP IgG2b (4F8 clone) at 4 °C for 60 min. For the phagocytosis assay, MDM were seeded 48 h earlier with or without IFN γ or IL-10 on 96 well plates at a density of 1×10^5 cells in 200 μ l of RPMI supplemented with 10% FBS per well. Anti-DNP opsonized (IgG-SRBC) or non-opsonized SRBC (TNBS-SRBC) were added and incubated with MDM cells for 30 min at 37 °C in a 5% CO $_2$ humidified incubator. MDM were then washed with PBS to remove unbound SRBCs. Non-internalized SRBCs were lysed with distilled water and after washing, SRBC ingestion by MDM cells was determined by the DBA oxidation assay [17]. Hemoglobin pseudoperoxidase activity was measured in detergent lysates of the phagocytes, using an ELISA reader photometer at 492 nm. Each condition was assayed in duplicate wells. The fold increase in phagocytosis was calculated considering the optical density of non-treated MDM that internalized IgG-SRBC as 100%.

2.7. Intracellular concentration of Ca $^{2+}$ ions

Changes in the intracellular concentration of Ca $^{2+}$ ions were measured using Fluo-3 and Fura Red. MDM cells (5×10^6) were loaded with 6 μ g/mL of Fluo-3 and 10 μ g/mL of Fura Red in the presence of pluronic acid (5 mg/mL) for 45 min in the dark at room temperature. Cells were then washed with RPMI with 2% FBS and incubated in the dark 45 min at room temperature. The cells were kept at 4 °C in RPMI without serum until assayed. The cellular response was analyzed by flow cytometry using a FACscan flow cytometer with CellQuest software (Becton Dickinson). Fluorescence of resting cells was measured for 30 to 50 s to determine the baseline. Fab fragments of anti-Fc γ RI or anti-Fc γ RII (32.2 or IV.3 antibodies) were added, and data were acquired for another 6 min. After crosslinking of Fc γ Rs by addition of F(ab) $_2$ goat anti-mouse IgG, data were acquired for five more minutes. The results are presented as the ratio between mean fluorescence intensity (MFI) of Fluo-3 and MFI of Fura Red at the indicated time points.

2.8. Phagocytosis of *E. coli*

Phagocytosis of *E. coli* was determined by the Vybrant Phagocytosis assay kit. The fluorescein-conjugated *E. coli* BioParticle suspension was prepared following the manufacturer's instructions. The MDM suspension (1×10^6 treated or non-treated MDM) was incubated with 50 μ l of fluorescent *E. coli* suspension with gently shaking for 20 min at 37 °C. Negative controls were prepared in identical conditions but incubated at 4 °C. Phagocytosis was stopped by washing the suspension of MDM and bacteria with ice-cold PBS. The samples were fixed with PFA 4% and kept at 4 °C until analysis in a FACscan cytometer with CellQuest software (Becton Dickinson). Each sample was analyzed before and immediately after addition of Trypan Blue (1 mg/mL, pH 4.5), to quench the fluorescence of non-engulfed bacteria. Phagocytic index was calculated multiplying the GMF of positive cells by the percentage of positive cells. The negative control (cells incubated at 4 °C with bacteria) was used to set the negative population. Phagocytosis of *E. coli* (% of control) was calculated as the ratio between the phagocytic index of treated cells and the phagocytic index of non-treated cells.

2.9. Rac-GTP and Cdc42-GTP assays

Before the assay, MDM (10×10^6 cells in 10 cm dishes) were incubated for 48 h with or without IFN γ (300 ng/ml) in RPMI with 10% of FBS. Cells were rinsed once with PBS solution and lysed in 1 ml of ice-cold lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA,

150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ and 1% Triton X-100) containing protease inhibitors (10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM β-glycerol phosphate, 1 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate) for 15 min. Extracts were cleared, and aliquots were saved to estimate total expression of Rac1 and Cdc42. The rest of the lysate was incubated with 50 µl of GST-PAK CRIB-coated beads for 42 min at 4 °C. Beads were washed three times with 1 ml of lysis buffer and resuspended in 40 µl of Laemmli's sample buffer and boiled. After electrophoresis, proteins were transferred to Immobilon membranes (Millipore, Billerica, MA), and the following antibodies were used for the immunoblots: mouse monoclonal antibody against Rac1, HRP goat anti-mouse, rabbit polyclonal antibody against Cdc42, and goat anti-rabbit HRP. The Immobilon Western HRP substrate peroxidase solution (Millipore, Billerica, MA) was used as substrate. Digitalized images of the developed films used to capture the chemiluminescent signals were obtained with the Gel-Doc 2000 System (Bio-Rad) and analyzed with the Bio-Rad Quantity One software.

2.10. Statistical analysis

Data were analyzed using a paired Student's *t*-test. The Minitab program was used for calculating probability values at 95% of confidence. *P* values < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. IFN γ decreases and IL-10 increases the phagocytosis of IgG-SRBC

We first evaluated the engulfment of IgG-SRBC by MDM previously treated for 48 h with different concentrations of IFN γ or IL-10. As reported before [6,18,19], treatment of human MDM with IFN γ resulted in a significantly reduced Fc γ R-mediated phagocytosis (Fig. 1). In contrast, IL-10 treatment increased the phagocytosis of IgG-SRBC (Fig. 1). Non-opsonized SRBC were not internalized by control or cytokine-treated cells (not shown). The effects of both cytokines on phagocytosis were also evident when phagocytosis was evaluated microscopically (data not shown).

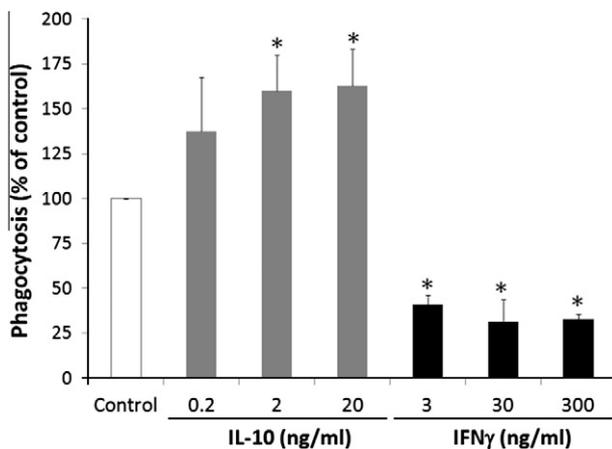


Fig. 1. IFN γ inhibits phagocytosis of IgG-SRBC. MDM were treated with the indicated concentrations of IFN γ or IL-10. After 48 h, MDM were harvested and incubated with IgG-SRBC for 20 min at 37 °C. Non-internalized SRBC were lysed, and phagocytosis was evaluated by the DBA oxidation assay measured by spectroscopy at 492 nm. Percentages of phagocytosis were calculated relative to the absorbance of control (non-treated) MDMs. Data are the mean of three independent experiments. Error bars represent SD. **p* < 0.05 as determined by paired *t*-test, comparing control against treated cells.

3.2. Modulation of Fc γ R expression in MDM by IFN γ and IL-10

Flow cytometry was used to determine whether IFN γ and IL-10 induce changes in the expression level of the different Fc γ Rs which could be related to the observed effect on phagocytosis. As previously reported, IFN γ up-regulated membrane expression of Fc γ RI [6,14,20,21], and induced a slight decrease in Fc γ RIII expression (Fig. 2A). Extracellular staining of Fc γ RII with mAb IV.3 did not change after IFN γ treatment. Since this mAb does not discriminate among Fc γ RII isoforms, we used intracellular staining to discriminate between Fc γ RIIa and Fc γ RIIb, the functionally distinct isoforms of Fc γ RII. IFN γ did not modify the expression of the activatory Fc γ RIIa, whereas the expression of the inhibitory Fc γ RIIb decreased by approximately 30 % (Fig. 2B). These results indicate that although IFN γ modified Fc γ Rs expression, the induced changes cannot explain the significant reduction of Fc γ R-mediated phagocytosis after IFN γ treatment. Culture of MDM for 48 h with IL-10 caused increases in the expression of Fc γ RI, Fc γ RIIb, and Fc γ RIII, and did not modify Fc γ RIIa expression (Fig. 2A, B).

3.3. Effects of IFN γ and IL-10 on Syk phosphorylation mediated by Fc γ Rs

In order to identify at which level IFN γ and IL-10 may exert their opposite effects on Fc γ R-mediated phagocytosis, we looked for differences in the magnitude of Fc γ R-induced signaling events in MDM treated or not with IFN γ and IL-10. It is known that Syk activation is an early and essential event for Fc γ R mediated phagocytosis [22,23]. Thus, MDM treated with IFN γ or IL-10 were

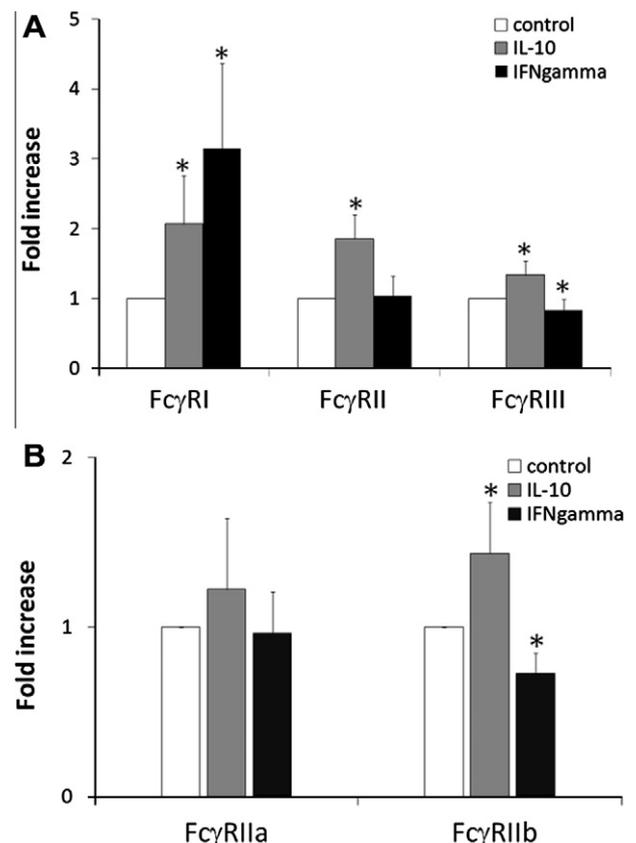


Fig. 2. Effect of IFN γ and IL-10 on Fc γ R expression in MDM. MDM were treated with IFN γ (3 ng/mL) or IL-10 (20 ng/mL). After 48 h, MDM were harvested and stained with specific anti-Fc γ R antibodies. Fold increase was calculated as the ratio between GMF of cytokine-treated cells and GMF of control cells. Data is expressed as mean values (A, *n* = 13; B, *n* = 5). Error bars represent SD. **p* < 0.05 as determined by paired *t*-test, comparing control against treated cells.

stimulated through Fc γ Rs using specific antibodies against Fc γ RI and Fc γ RII, and the extent of Syk phosphorylation was assessed by immunoblotting. Treatment with either IFN γ or IL-10 did not alter the basal level of Syk phosphorylation before Fc γ Rs crosslinking. In cells treated with IFN γ and IL-10, the levels of Syk phosphorylation after Fc γ RI crosslinking were 3-fold and 2-fold higher respectively, as compared to non-treated cells. This is consistent with the observed increase in Fc γ RI expression induced by each cytokine. When cells were stimulated through Fc γ RII, the phosphorylation level of Syk was not significantly different among MDM treated with IFN γ or IL-10 and control cells (Fig. 3).

3.4. IFN γ did not affect, whereas IL-10 increased Ca²⁺ mobilization induced by Fc γ R crosslinking

Fc γ R crosslinking induces an increase in the intracellular level of calcium ions ([Ca²⁺]_i) [12,24]. We therefore compared the changes in [Ca²⁺]_i induced by Fc γ R crosslinking with specific antibodies against Fc γ RI or Fc γ RII, to determine whether MDM responses are affected by treatments with IFN γ or IL-10. Despite slight differences on the kinetics of calcium rise, the peak [Ca²⁺]_i levels in IFN γ treated cells and control cells were similar after Fc γ RI or Fc γ RII crosslinking. In contrast, IL-10 treated MDM showed higher maximum levels of [Ca²⁺]_i after stimulation through both Fc γ RI and Fc γ RII (Fig. 4). The above results suggest that the effect of IFN γ treatment on Fc γ R-mediated phagocytosis do not arise from effects on early signaling events.

3.5. IFN γ triggers actin polymerization, down regulates phagocytosis of *E. coli* and inhibits F-actin increase in response to IgG–SRBC or CCL5 stimulation

Phagocytosis is dependent on F-actin assembly [13,25–27]. In order to evaluate if IFN γ or IL-10 had an effect on actin polymeri-

zation which could be related to their effect on phagocytosis, we used flow cytometry to evaluate the basal level of F-actin in MDM with or without cytokine treatment. We found that MDM cultured in the presence of IFN γ for 48 h had significantly higher levels of F-actin compared with cells without IFN γ . MDM cells cultured in the presence of IL-10 had the same basal levels of F-actin as control cells (Fig. 5). We then analyzed the effect of IFN γ treatment on actin polymerization induced by Fc γ R crosslinking, necessary to internalize IgG–SRBC. The F-actin levels were increased after 3 min of stimulation with IgG–SRBC in non-treated MDM (Fig. 6A), whereas the F-actin levels were not increased in IFN γ -treated MDM in response to stimulation (Fig. 6B).

If the decrease in Fc γ R mediated phagocytosis induced by IFN γ is due to the increased level of F-actin, phagocytosis through other receptors would be affected in the same way. To evaluate this hypothesis, we analyzed the effect of IFN γ treatment on phagocytosis of FITC-labeled *E. coli* using flow cytometry. IFN γ -treated MDM internalized significantly fewer bacteria than MDM cultured with medium only, while IL-10 treated MDM showed a higher phagocytic index than control cells (Fig. 7B and E). The reduced phagocytic index shown by IFN γ treated MDM cannot be attributed to a reduction in the binding of bacteria, since the binding of bacteria to IFN γ treated cells (measured at 4 degrees) was higher as compared with control cells (not shown). Higher concentrations of IFN γ (300 ng/mL) induced a more pronounced decrease of phagocytosis (Fig. 7, compare last two rows of column B). When we compared the effect of IFN γ on cells from different donors, we observed an inverse relationship between the IFN γ -induced increase in the basal level of F-actin and the decrease in the phagocytic index (Fig. 8), suggesting that the relative increase in F-actin basal levels determines a corresponding decrease in the phagocytic capacity. Similar to its effect on Fc γ Rs-mediated phagocytosis, treatment of MDM with IL-10 (20 ng/mL and 200 ng/mL) resulted

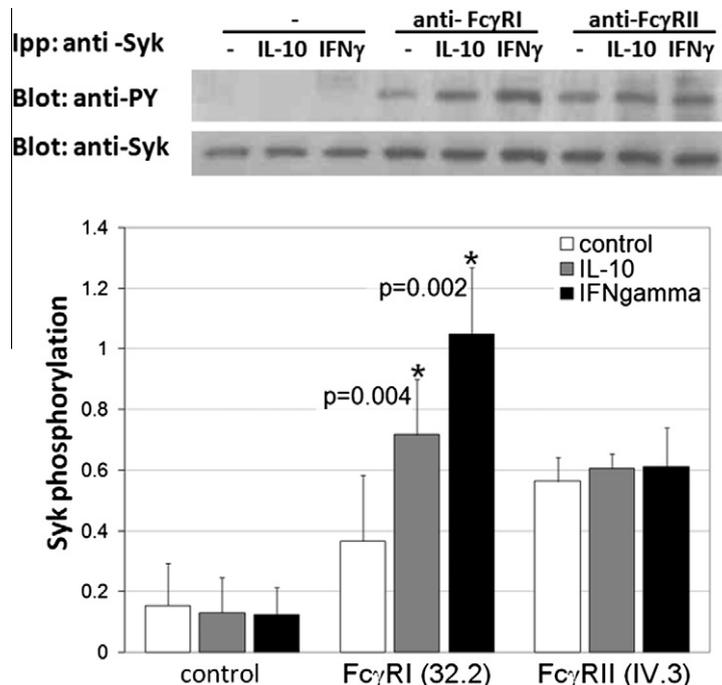


Fig. 3. Effect of IFN γ and IL-10 on Syk phosphorylation. MDM were treated or not with IFN γ (30 ng/mL) or IL-10 (20 ng/mL). After 48 h, MDM were harvested and stimulated or not with monoclonal anti-Fc γ RI or anti-Fc γ RII antibodies and a secondary antibody (goat anti-mouse IgG). Cells were lysed and Syk was immunoprecipitated. Immunoprecipitates were resolved on SDS–PAGE and blotted onto nitrocellulose membranes. Tyrosine-phosphorylated proteins were detected with PY20 anti-phosphotyrosine antibodies (Blot anti-PY). Bands in the upper panels show a phosphorylated protein of approximately 72 kDa. The same membranes were stripped and reprobed with an anti-Syk polyclonal antibody (Blot anti-Syk). The lower panel shows the averaged results from four independent experiments. Syk phosphorylation was calculated as the ratio between the optical density (O.D.) of the Syk band in the anti-PY blot and O.D. of the Syk band in the anti-Syk blot. Error bars represent SD. * $p < 0.05$ as determined by paired *t*-test, comparing control against treated cells.

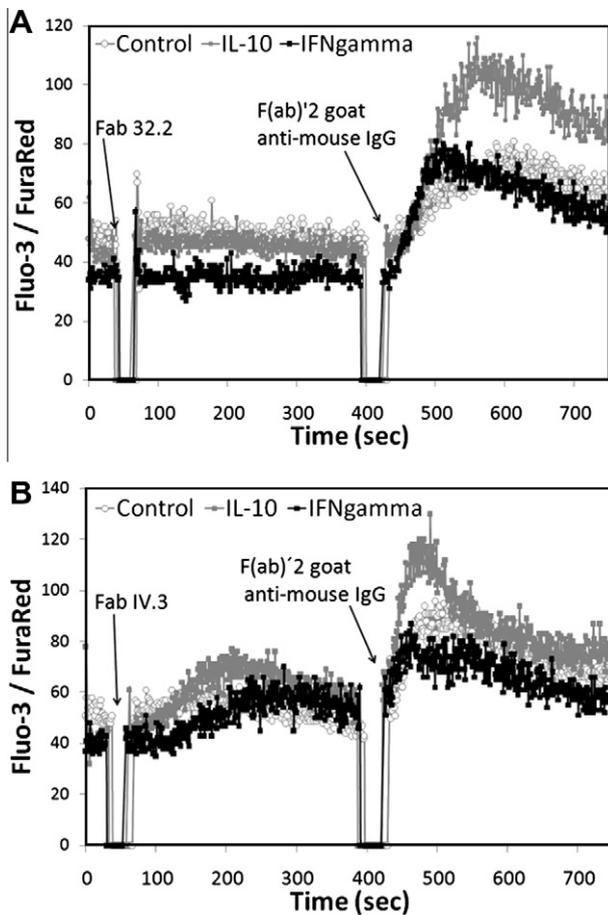


Fig. 4. IL-10 increases the rise in $[Ca^{2+}]_i$ induced by Fc γ RI and Fc γ RII crosslinking, whereas IFN γ does not modify it. MDM were treated or not with IFN γ (3 ng/mL) or IL-10 (20 ng/mL). After 48 h, MDM were harvested and stimulated with Fab fragments of anti-Fc γ RI (Fab 32.2) (A) or anti-Fc γ RII (Fab IV.3) (B), and (Fab) $_2$ fragments of goat anti-mouse IgG. Fab 32.2 and Fab IV.3 were added and incubated for approximately 6 min. Subsequently, F(ab) $_2$ of goat anti-mouse IgG was added to induce Fc γ R crosslinking. Intracellular calcium levels were monitored by the ratio of Fluo3 to FuraRed fluorescence, determined by flow cytometry. One representative experiment out of four is shown.

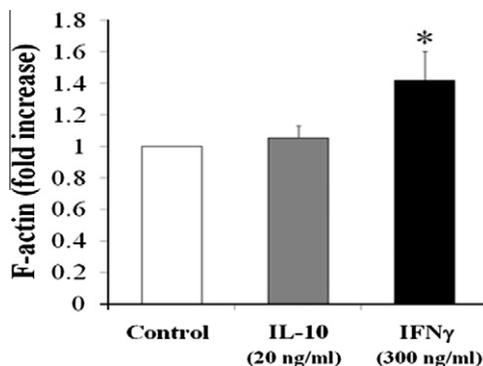


Fig. 5. IL-10 did not modify basal F-actin levels, whereas IFN γ induces actin polymerization. MDM were treated or not with IL-10 or IFN γ . After 48 h of treatment the cells were stained with NBD-phalloidin to determine F-actin levels. The samples were analyzed by flow cytometry. Fold increase of F-actin was calculated as the ratio between GMF of cytokine-treated cells and GMF of control cells. Data is expressed as mean values (control $n = 17$; IFN γ $n = 17$; IL-10 $n = 7$). Error bars represent SD. * $p < 0.05$ as determined by paired t -test, comparing control against treated cells.

in an increased phagocytosis of bacteria (an increase of almost 2-fold) (Fig. 7B).

In order to determine whether the increase in the basal level of F-actin in MDM treated with IFN γ would affect other cellular responses which are dependent on actin rearrangement, we evaluated the increase in F-actin in response to the chemokine CCL5 (RANTES). MDMs treated with two concentrations of IFN γ (30 and 300 ng/mL) or IL-10 (20 and 200 ng/mL) were stimulated for 20 s with CCL5, and the levels of F-actin were determined with NBD-phalloidin. The response to CCL5 in MDM treated with IL-10 was slightly higher than the response of control cells, whereas in MDM cultured with IFN γ there was no increase in F-actin in response to CCL5 (Fig. 7D).

Thus, higher basal levels of polymerized actin before stimulation are associated with diminished capacity to respond to additional inducers of actin cytoskeleton reorganization, as phagocytic or chemotactic stimulus.

3.6. IFN γ induces activation of Rac1 but not of Cdc42

Activation of Rac1 and Cdc42 is involved in actin polymerization and is necessary for phagocytosis mediated by Fc γ Rs [28,29]. Since our previous results showed an increase in polymerized actin after IFN γ treatment, we evaluated the activation state of Cdc42 and Rac1 in these cells and in cells treated with IL-10. For this, we performed active Rac1 and active Cdc42 pull-down assays using GST-PAK CRIB coated beads, from total lysates of cells treated with IFN γ , IL-10 or untreated cells. MDM treated 48 h with IFN γ had higher levels of Rac1-GTP than non-treated MDMs, whereas Cdc42-GTP levels were not significantly different in IFN γ treated MDM compared to non-treated cells (Fig 9). Treatment with IL-10 did not result in changes in the activation state of Rac1 or Cdc42 (Fig 9).

3.7. PI3K inhibition prevents IFN γ mediated actin polymerization

In addition to the JAK/STAT proteins, other molecules, including PI3K, have been shown to be involved in IFN γ mediated signaling [30–32]. To determine if PI3K participates in the signaling cascade triggered by IFN γ which leads to actin polymerization, we used LY294002, an inhibitor of PI3K. Since incubation with LY294002 for 48 h would induce a great loss of viability of MDM, we treated MDM with IFN γ for 12 and 20 h, with or without LY294002, and determined the basal levels of F-actin and the phagocytic capacity. We found that 20 h of treatment with IFN γ was sufficient to observe an increase in basal F-actin levels and a reduction in phagocytosis. MDM were first incubated for 40 min with LY294002 (50 μ M), and subsequently IFN γ (30 ng/mL) was added. After incubation for 20 h with LY294002, IFN γ or both (LY294002 + IFN γ), MDM were stained with NBD-phalloidin to determine F-actin levels. As expected, LY294002 decreased the capacity of MDM to internalize bacteria (data not shown). NBD-phalloidin staining showed that treatment with LY294002 or vehicle alone (DMSO) had no effect on the levels of F-actin. However, incubation with LY294002 completely prevented the IFN γ -induced increase in basal levels of F-actin (Fig. 10A and B). These data indicate that PI3K activity is necessary for the effect of IFN γ on actin polymerization.

4. Discussion

Although the inhibitory effect of IFN γ and the activatory effect of IL-10 on phagocytosis of IgG-opsonized particles and bacteria by mononuclear phagocytes have been previously reported [3,4,6,7,9,10], the molecular mechanisms responsible for these effects are unknown. Both IFN γ and IL-10 induce an increase in the expression of Fc γ Rs, particularly of Fc γ RI. However, only for IL-10 does the increase in Fc γ R expression correlate with a

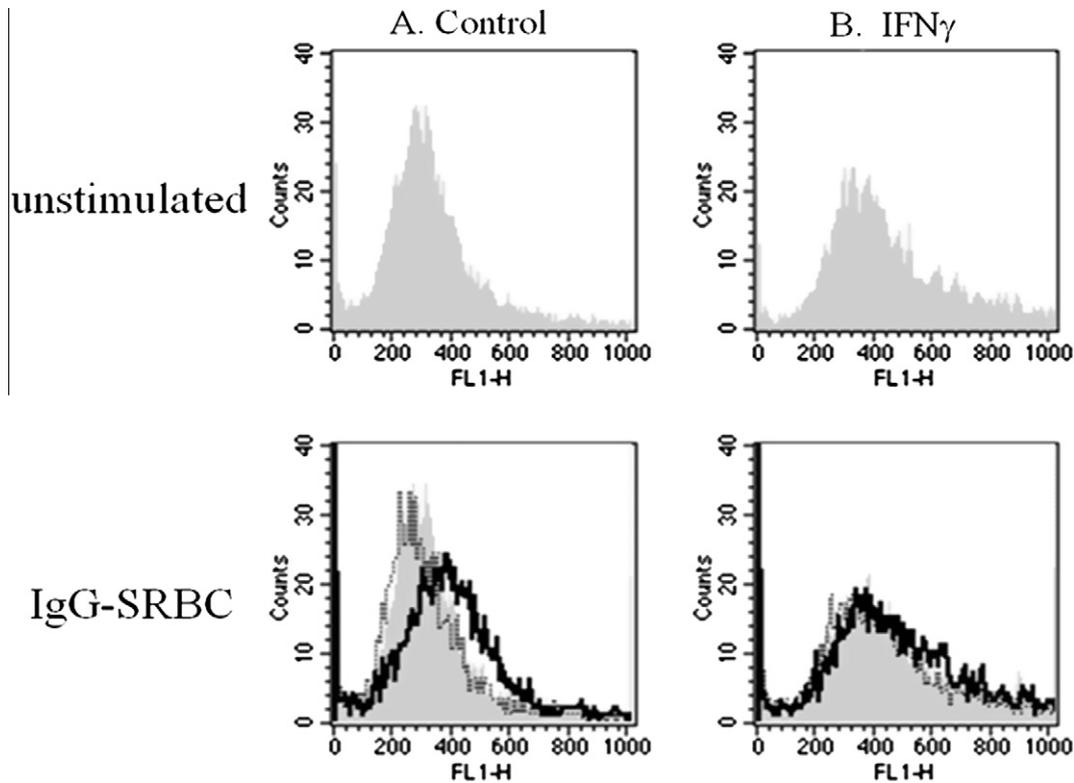


Fig. 6. Fc γ R crosslinking did not induce an increase in F-actin levels in MDM treated with IFN γ . F-actin staining histograms of control (column A) or IFN γ treated (300 ng/ml) (column B) MDMs. F-actin level was evaluated using NBD-phalloidin. The staining was analyzed by flow cytometry. The histograms on the top show the initial levels of F-actin before stimulation. Histograms at the bottom show the F-actin levels after stimulation for 3 min with TNBS-SRBC (gray line) or IgG-SRBC (black line). For comparison, the histogram from non stimulated MDMs is shown (shaded histogram). One out of three independent experiments is shown.

corresponding increase in phagocytosis. In contrast, although IFN γ also induces an increase in Fc γ R expression, it induces a significant decrease in Fc γ R-mediated phagocytosis. To understand these contrasting observations we evaluated the effect of IL-10 and IFN γ on Fc γ R signaling pathways.

We found that in MDM, IFN γ up regulates Fc γ R1 expression and down regulates the expression of the inhibitory isoform Fc γ R11b. Thus, the effect of IFN γ on the overall balance between activatory and inhibitory Fc γ R isoforms would be towards a more activatory phenotype. In spite of this, IFN γ does not enhance but rather inhibits phagocytosis mediated by Fc γ R. On the other hand, IL-10 augments the expression of all Fc γ R classes (except Fc γ R11a). This could be partially responsible for the increase in phagocytosis. Our results and those of others have shown that in human monocytes/macrophages, IL-10 increases phagocytosis of *E. coli* [8,10,15,33], IgG opsonized particles (erythrocytes [6,16], B cells [9], and latex beads [15]), and apoptotic cells [10], suggesting that the effects of IL-10 are not specific for a particular phagocytic receptor. It is possible that, in addition to increasing the expression of phagocytic receptors (CD16, CD64, CD14, scavenger receptors) [8], IL-10 modulates the expression and/or activation of signaling molecules involved in various phagocytic pathways, resulting in enhanced phagocytosis, which is one of the features of M2 macrophages. IL-10 drives macrophages towards the M2 phenotype, a phenotype involved in tissue repair and dampening of inflammation [8,34,35].

Since the changes in Fc γ R expression induced by IFN γ cannot explain the negative effect on phagocytosis, we were interested in determining at what stage of the signaling pathway IFN γ could be exerting its modulatory effect. We examined the effects of IFN γ and IL-10 on two of the early biochemical events of Fc γ R signaling, Syk activation and rise in [Ca $^{2+}$] $_i$. Basal levels of Syk phosphoryla-

tion were not altered by either IFN γ or IL-10. Syk phosphorylation induced by Fc γ R1 crosslinking was significantly higher in cells treated with any of the cytokines than in untreated cells, with the highest effect caused by IFN γ . This correlates with the positive effect of IFN γ and IL-10 on Fc γ R1 expression. Syk phosphorylation induced by Fc γ R11 crosslinking was not significantly altered by IFN γ or IL-10 treatment. Therefore the effect of IFN γ on Syk phosphorylation does not coincide with the effect on phagocytosis.

The rise in [Ca $^{2+}$] $_i$ was altered differently by IFN γ and IL-10. MDM treated with IL-10 showed higher levels of [Ca $^{2+}$] $_i$ after Fc γ R1 or Fc γ R11 crosslinking, as compared to those observed in cells treated with IFN γ and control cells. Given that Fc γ R expression is increased by IL-10, it is not surprising that the rise in [Ca $^{2+}$] $_i$ induced by Fc γ R crosslinking was also increased. It was unexpected that IFN γ , which also increased Fc γ R expression and induces higher levels of Syk phosphorylation in response to Fc γ R crosslinking, did not modify [Ca $^{2+}$] $_i$ rise. This implies that IFN γ affects the coupling between Syk activation and calcium mobilization. However, since the levels of [Ca $^{2+}$] $_i$ observed in IFN γ treated and control cells were the same, the decrease in phagocytosis induced by IFN γ should also involve alterations in more downstream events.

Previous reports have demonstrated that IFN γ can diminish monocyte responses that depend on cytoskeleton reorganization. Thus, monocytes cultured in the presence of IFN γ showed defective internalization of bacteria and SRBC, unopsonized or opsonized with C3b/C3bi or IgG [3–7]. In addition to phagocytosis, migration is also affected [2,36–40]. Yang Hu and coworkers recently reported evidence of the inhibitory effect of IFN γ on monocyte chemotaxis [2]. These authors showed that freshly isolated human monocytes treated with IFN γ were not able to migrate in response to CCL2. They suggested that IFN γ inhibits monocyte migration by a mechanism than involved decreased remodeling

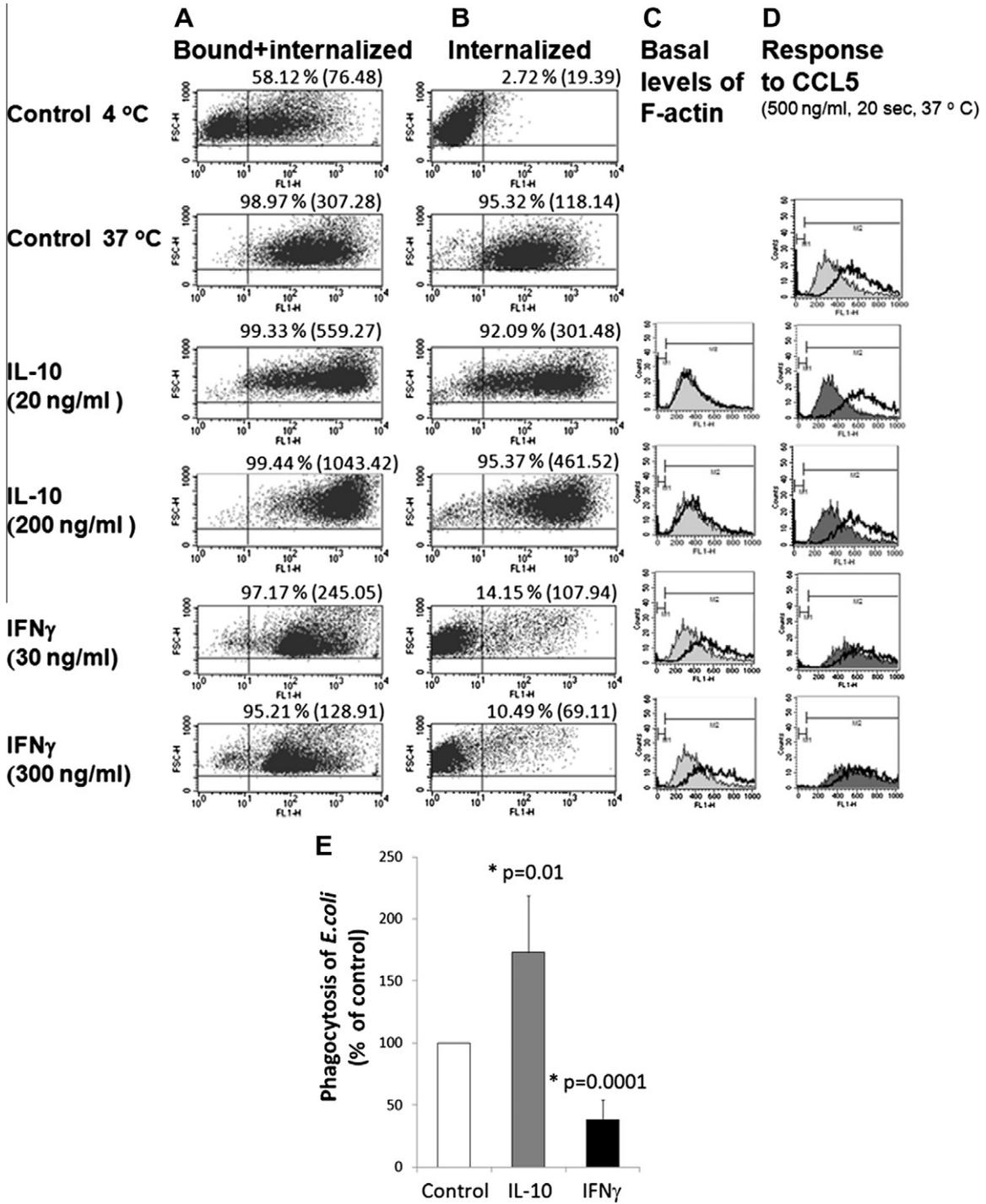


Fig. 7. IFN γ inhibits phagocytosis of *E.coli* and the increase of F-actin levels after CCL5 stimulation. MDM were treated with IFN γ or IL-10 at the concentrations indicated at far left. After 48 h, MDM were incubated with *E. coli*-FITC for 20 min at 37 °C (columns A and B) or stained with NBD phalloidin (columns C and D). Phagocytosis and NBD-phalloidin staining were evaluated by flow cytometry. Fluorescence in plots of column A comes from bound plus internalized bacteria; in column B comes only from internalized bacteria, after addition of Trypan blue to quench extracellular fluorescence. The percentages of positive cells and the GMF values are shown above each dot plot in columns A and B. Column C shows histograms of basal level of F-actin in untreated cells (filled histograms) overlapped with histograms of basal F-actin after treatments (empty histograms). Columns D shows F-actin levels before (filled histograms) and after (empty histograms) stimulation with CCL5. A, B, C, and D are data from cells of the same donor and are representative of the results from five different donors. E. Phagocytosis of *E. coli* by MDM untreated or treated with IL-10 (20 ng/mL) or IFN γ (30 ng/mL). Data are expressed as the phagocytic index of cytokine treated cells relative to the phagocytic index of control cells. Bars are the mean of seven independent experiments. Error bars represent SD. * $p < 0.05$ as determined by paired t -test, comparing control against treated cells.

of the actin cytoskeleton. In their study they observed that IFN γ induced higher basal F-actin levels, although this increase did not reach statistical significance. In our study, we found significantly higher F-actin basal levels after IFN γ treatment as compared with

non-treated MDM. Considering our results on the phagocytosis, the higher basal levels of F-actin, the lack of additional F-actin assembly in response to CCL5 and a phagocytic stimulus in IFN γ treated MDM, and a previous report of the inability of IFN γ -treated mono-

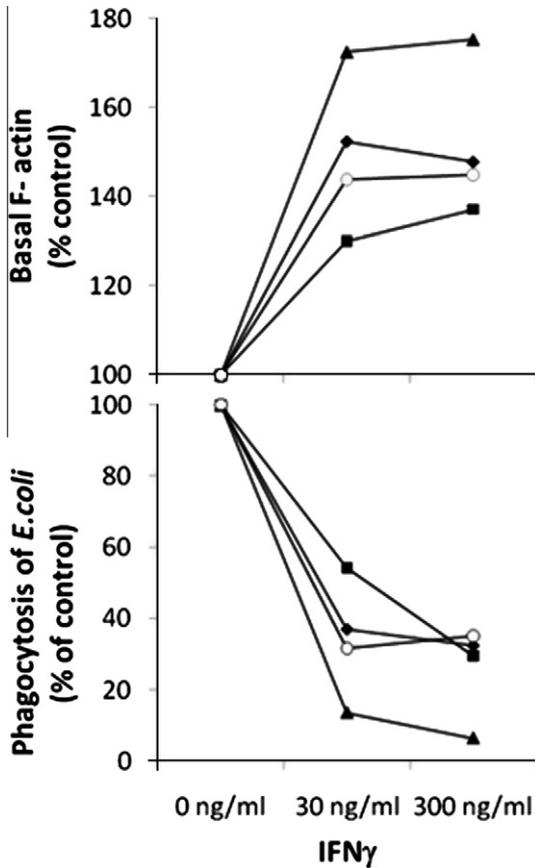


Fig. 8. Increased F-actin basal levels correlate with reduced phagocytosis of *E. coli*. MDM were treated for 48 h with the indicated concentrations of IFN γ . F-actin levels (upper graph) and phagocytosis of *E. coli*-FITC (lower panel) were evaluated by flow cytometry. Each symbol (\blacktriangle , \blacklozenge , \circ , \blacksquare) shows results with cells from different individual donors. Data are presented as percentages of the response of untreated cells from the corresponding donor.

cytes to migrate in response to chemokines [2], we propose that the modulation exerted by IFN γ on migration and phagocytosis may be related to the increase in the basal levels of F-actin.

It has been reported that expression of a constitutively active Rac1 in 3T3 fibroblasts results in higher F-actin basal levels [41], raising the possibility that Rac1 activation induced by IFN γ could be involved in elevating the basal levels of F-actin. Therefore, we evaluated the activation of Rac1 after IFN γ treatment. We found

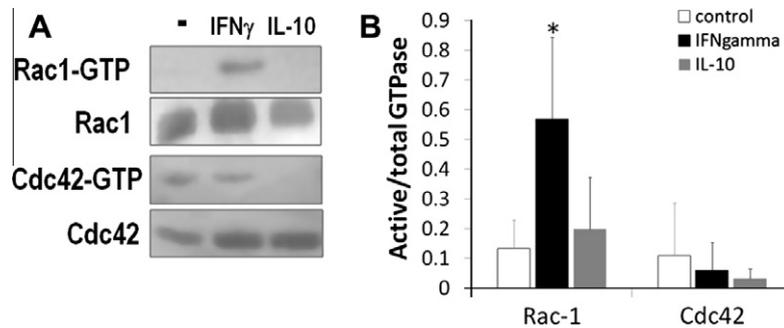


Fig. 9. IFN γ induces Rac1 but not Cdc42 activation. MDMs were treated or not with IFN γ (300 ng/ml) or IL-10 (20 ng/ml). After 48 h of treatment the cells were lysed and pull down assays were performed. GTP-Rac1 and GTP-Cdc42 were pulled down using GST-PAK CRIB beads. A. The proteins were resolved on SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose papers. The presence of Rac1 and Cdc42 was determined using specific antibodies. “Rac1-GTP” and “Cdc42-GTP” blots are from the pulled down samples, whereas “Rac1” and “Cdc42” blots are from total lysates of the corresponding cells (untreated or cytokine-treated). Thus the blots indicated in the Fig. as “Rac1” and “Cdc42” show total Rac1 or Cdc42. B. Active GTPase was calculated as the ratio between the optical density (O.D.) of the Rac-GTP or Cdc42-GTP band from the pull down samples and O.D. of the Rac1 or Cdc42 bands from the total lysates. Data are presented as the mean of four independent experiments. Error bars represent SD. * $p < 0.05$ as determined by paired Student’s *t*-test, comparing control against treated cells.

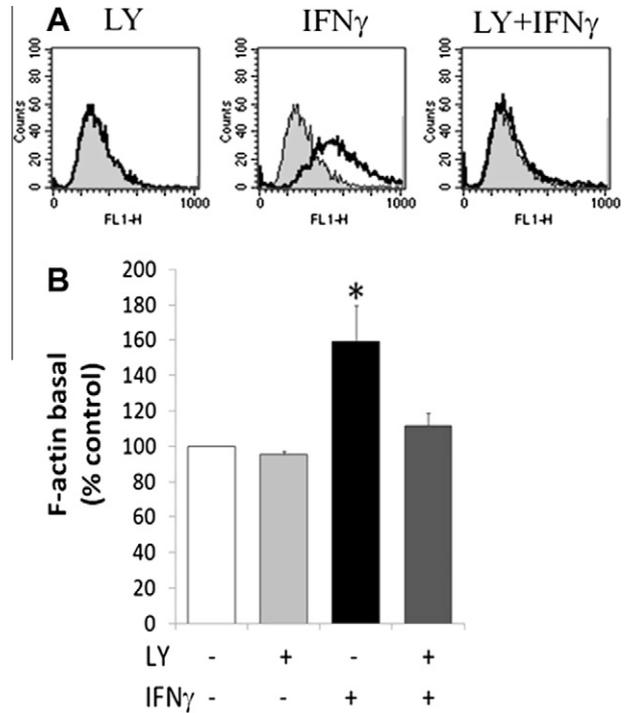


Fig. 10. IFN γ requires PI3K to induce actin polymerization. MDM were treated for 20 h with DMSO (vehicle alone, 1.5 μ l), LY294002 (50 μ M), IFN γ 30 ng/mL or LY294002 + IFN γ . After treatment, the cells were stained with NBD-phalloidin and evaluated by flow cytometry. Level of F-actin in cells treated with DMSO (shaded histograms) is shown in A overlapped with histograms from cells with the treatment indicated over each histogram. One representative experiment out of three is shown. B shows the percentage of F-actin levels after treatment with LY, IFN γ or LY + IFN γ relative to F-actin levels in control cells (cells treated with DMSO). Data are the mean of three independent experiments. Error bars represent SD. * $p < 0.05$ as determined by paired *t*-test, comparing DMSO treated cells against LY294002, IFN γ or LY294002 + IFN γ cells. LY: LY294002.

that treatment of MDM with IFN γ resulted in higher levels of active Rac1, and did not modify the levels of active Cdc42. This suggests that IFN γ stimulates actin polymerization by a pathway that involves Rac1 activation but not Cdc42. Both Rac1 and Cdc42 activities are required for optimal Fc γ R mediated phagocytosis, as it has been shown using dominant negative mutants of these GTPases [28,41,42]. We propose that Rac1 activation induced by IFN γ reduces the pool of inactive Rac1 available for participation in regulation of actin dynamics, thus affecting all cell responses which

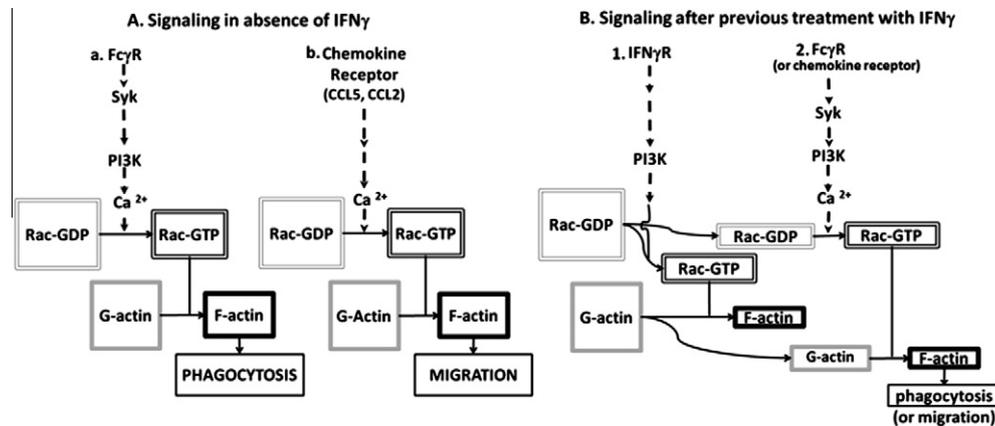


Fig. 11. The effect of IFN γ treatment on actin polymerization affects macrophage responses. A. Signaling pathway mediated by Fc γ Rs (a) or chemokine receptors (b) in the absence of IFN γ stimulation. Fc γ R crosslinking triggers, among others, activation of Syk and PI3K, calcium mobilization, Rac1 activation, and actin polymerization (F-actin), events necessary for phagocytosis. On the other hand, chemokine receptor signaling pathway involves, among other events, PI3K activation, calcium mobilization, Rac1 activation and actin polymerization, necessary for cell migration. B. IFN γ induces, through a signaling pathway that involves PI3K, activation of Rac1 and actin polymerization. This affects the pool of molecules such as Rac1 and monomeric actin available for the polymerization of actin necessary for phagocytosis (and migration). As a result, phagocytosis is not as efficient as in cells not treated with IFN γ . The size of the boxes of Rac1, G-actin, F-actin, phagocytosis and migration represent the size of the pool or the response in each situation.

require remodeling of actin cytoskeleton, such as migration and phagocytosis, independently of the receptor involved. While IFN γ is present, part of the signaling components are occupied and cannot return to the inactive form, therefore the available pool of inactive molecules is lower than without IFN γ . This compromises the ability of the cell to respond to additional stimuli which would require a certain pool of inactive molecules for optimal response (Fig. 11). Results of the effects of IL-10 are consistent with this hypothesis. Since treatment of MDMs with IL-10 does not induce Rac1 or Cdc42 activation and does not increase the levels of F-actin, the pools of inactive molecules are intact, thus allowing that the increase in the expression of Fc γ R (or CCR1 and CCR5, two CCL5 receptors [43]) induced by IL-10 results in an increment of phagocytosis mediated by Fc γ R (this study) and migration in response to CCR1 and CCR5 ligands [43].

Additional signaling proteins recruited to the IFN γ R after IFN γ stimulation, other than JAK/STAT proteins, have been identified. In addition to GTPases, these proteins include Src kinases, PI3K, adaptor molecules and guanidine exchange factors (GEFs) [30–32]. Using the PI3K inhibitor LY294002, we demonstrated that PI3K activity is required for actin polymerization induced by IFN γ . Even though PI3K inhibition restores F-actin basal levels in MDM treated with IFN γ + LY294002, phagocytic capacity cannot be restored, since it is known that PI3K activity is required for phagocytosis [44,45]. Other signaling components which might be involved in IFN γ mediated increase in F-actin are currently unknown and must be elucidated.

In conclusion, we have shown that IFN γ induces actin polymerization by a mechanism that involves PI3K activity. We also found that IFN γ induces Rac1 activation, without modifying Cdc42-GTP levels. The involvement of other molecules in the actin polymerization signaling cascade mediated by IFN γ remains to be elucidated. We suggest that the negative effect of IFN γ in phagocytosis is mediated by induction of actin polymerization previous to the phagocytic stimulation, and not by directly affecting the early events of the Fc γ R signaling pathway.

Acknowledgements

This work was supported by research grants from CONACYT (80301) and DGAPA-UNAM (IN222008). During the course of these studies, D. Frausto-Del-Río was supported by fellowships from

CONACYT (203458 and 16414). This work is part of the Ph.D. Thesis (PDCB-UNAM) of D. Frausto-Del-Río. We thank the Banco Central de Sangre, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, for donation of buffy coats from healthy donors.

References

- [1] Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 2004;75:163–89.
- [2] Hu Y, Hu X, Boumsell L, et al. IFN-gamma and STAT1 arrest monocyte migration and modulate RAC/CDC42 pathways. *J. Immunol.* 2008;180:8057–65.
- [3] Schlesinger LS, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN-gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. *J. Immunol.* 1991;147:1983–94.
- [4] Speert DP, Thorson L. Suppression by human recombinant gamma interferon of in vitro macrophage nonopsonic and opsonic phagocytosis and killing. *Infect. Immun.* 1991;59:1893–8.
- [5] Capsoni F, Minonzi F, Ongari AM, et al. Fc receptors expression and function in mononuclear phagocytes from AIDS patients: modulation by IFN-gamma. *Scand. J. Immunol.* 1994;39:45–50.
- [6] Capsoni F, Minonzi F, Ongari AM, et al. IL-10 up-regulates human monocyte phagocytosis in the presence of IL-4 and IFN-gamma. *J. Leukoc. Biol.* 1995;58:351–8.
- [7] Ruegg SJ, Jungi TW. Antibody-mediated erythrololysis and erythrophagocytosis by human monocytes, macrophages and activated macrophages. Evidence for distinction between involvement of high-affinity and low-affinity receptors for IgG by using different erythroid target cells. *Immunology* 1988;63:513–20.
- [8] Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 2001;19:683–765.
- [9] Leidi M, Gotti E, Bologna L, et al. M2 macrophages phagocytose rituximab-opsonized leukemic targets more efficiently than m1 cells in vitro. *J. Immunol.* 2009;182:4415–22.
- [10] Lingnau M, Hoflich C, Volk HD, et al. Interleukin-10 enhances the CD14-dependent phagocytosis of bacteria and apoptotic cells by human monocytes. *Hum. Immunol.* 2007;68:730–8.
- [11] Fitzer-Attas CJ, Lowry M, Crowley MT, et al. Fc gamma receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J. Exp. Med.* 2000;191:669–82.
- [12] Greenberg S. Diversity in phagocytic signalling. *J. Cell Sci.* 2001;114:1039–40.
- [13] Swanson JA. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008;9:639–49.
- [14] te Velde AA, de Waal Malefyt R, Huijbens RJ, et al. IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10. *J. Immunol.* 1992;149:4048–52.
- [15] Spittler A, Schiller C, Willheim M, et al. IL-10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4-driven CD23 expression on cultured human blood monocytes: effects of IL-10 and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis. *Immunology* 1995;85:311–7.

- [16] Liu Y, Masuda E, Blank MC, et al. Cytokine-mediated regulation of activating and inhibitory Fc gamma receptors in human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 2005;77:767–76.
- [17] Jungi TW. A rapid and sensitive method allowing photometric determination of erythrophagocytosis by mononuclear phagocytes. *J. Immunol. Methods* 1985;82:141–53.
- [18] Jungi TW, Lerch PG, Brcic M. The effect of recombinant interferon-gamma on human monocyte-derived macrophages. *Eur. J. Immunol.* 1987;17:735–8.
- [19] Jungi TW, Ruegg SJ, Morell A. Interferon gamma-treated human macrophages display enhanced cytolysis and generation of reactive oxygen metabolites but reduced ingestion upon Fc receptor triggering. *Hum. Immunol.* 1989;24:77–93.
- [20] de Waal Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R, et al. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *J. Immunol.* 1993;151:6370–81.
- [21] Wijngaarden S, van de Winkel JG, Jacobs KM, et al. A shift in the balance of inhibitory and activating Fc gamma receptors on monocytes toward the inhibitory Fc gamma receptor 1b is associated with prevention of monocyte activation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3878–87.
- [22] Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, et al. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc gamma receptors on macrophages. *J. Exp. Med.* 1997;186:1027–39.
- [23] Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi N, et al. The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc gamma receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol. Cell Biol.* 1998;18:4209–20.
- [24] Larsen EC, DiGennaro JA, Saito N, et al. Differential requirement for classic and novel PKC isoforms in respiratory burst and phagocytosis in RAW 264.7 cells. *J. Immunol.* 2000;165:2809–17.
- [25] Greenberg S, el Khoury J, di Virgilio F, et al. Ca(2+)-independent F-actin assembly and disassembly during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J. Cell Biol.* 1991;113:757–67.
- [26] Zigmond SH, Hirsch JG. Effects of cytochalasin B on polymorphonuclear leucocyte locomotion, phagocytosis and glycolysis. *Exp. Cell Res.* 1972;73:383–93.
- [27] Axline SG, Reaven EP. Inhibition of phagocytosis and plasma membrane mobility of the cultivated macrophage by cytochalasin B. Role of subplasmalemmal microfilaments. *J. Cell Biol.* 1974;62:647–59.
- [28] Cox D, Chang P, Zhang Q, et al. Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J. Exp. Med.* 1997;186:1487–94.
- [29] May RC, Machesky LM. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 2001;114:1061–77.
- [30] Gough DJ, Levy DE, Johnstone RW, et al. IFN-gamma signaling—does it mean JAK-STAT? *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19:383–94.
- [31] Hardy PO, Diallo TO, Matte C, et al. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in the regulation of protein kinase C-alpha activation in interferon-gamma-stimulated macrophages. *Immunology* 2009;128:e652–660.
- [32] Nguyen H, Ramana CV, Bayes J, et al. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon-gamma-dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression. *J. Biol. Chem.* 2001;276:33361–8.
- [33] Buchwald UK, Geerdes-Fenge HF, Vockler J, et al. Interleukin-10: effects on phagocytosis and adhesion molecule expression of granulocytes and monocytes in a comparison with prednisolone. *Eur J Med Res.* 1999;4:85–94.
- [34] Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 2005;5:953–64.
- [35] Mantovani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur. J. Immunol.* 2007;37:14–6.
- [36] Vermeire K, Heremans H, Vandeputte M, et al. Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J. Immunol.* 1997;158:5507–13.
- [37] Willenborg DO, Fordham S, Bernard CC, et al. IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 1996;157:3223–7.
- [38] Wu X, Hou W, Sun S, et al. Novel function of IFN-gamma: negative regulation of dendritic cell migration and T cell priming. *J. Immunol.* 2006;177:934–43.
- [39] Robson RL, McLoughlin RM, Witowski J, et al. Differential regulation of chemokine production in human peritoneal mesothelial cells: IFN-gamma controls neutrophil migration across the mesothelium in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 2001;167:1028–38.
- [40] Melrose J, Tsurushita N, Liu G, et al. IFN-gamma inhibits activation-induced expression of E- and P-selectin on endothelial cells. *J. Immunol.* 1998;161:2457–64.
- [41] Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, et al. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992;70:401–10.
- [42] Caron E, Hall A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 1998;282:1717–21.
- [43] Sozzani S, Ghezzi S, Iannolo G, et al. Interleukin 10 increases CCR5 expression and HIV infection in human monocytes. *J. Exp. Med.* 1998;187:439–44.
- [44] Cox D, Tseng CC, Bjekic G, et al. A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J. Biol. Chem.* 1999;274:1240–7.
- [45] Araki N, Johnson MT, Swanson JAA. Role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J. Cell Biol.* 1996;135:1249–60.