

2ej  
5

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"

**"INDUCCION A LA EXPRESION DE RECEPTORES FC EN MACROFAGOS Y GRANULOCITOS DE RATON POR INTERLEUCINA 1 RECOMBINANTE HUMANA"**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A I  
**FABIAN FLORES BORJA**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **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 está 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.

## INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MARCO TEORICO	
HEMATOPOYESIS Y FACTORES DE CRECIMIENTO	4
MACROFAGOS	8
GRANULOCITOS	15
INTERLEUCINA 1	19
INMUNOGLOBULINAS	29
RECEPTORES Fc	33
OBJETIVOS	42
MATERIALES Y METODO	43
RESULTADOS	51
DISCUSION	62
CONCLUSIONES	71
REFERENCIAS	72
APENDICE	81

## RESUMEN

Actualmente se sabe que la Interleucina 1 (IL-1) es una molécula que interviene en múltiples procesos biológicos que forman parte de los mecanismos de adaptación del individuo a condiciones de "stress"; se sabe también que sola, o en combinación con otros factores de crecimiento hematopoyético, induce la proliferación y diferenciación de células precursoras hematopoyéticas.

Tomando en cuenta la importancia que tienen los receptores Fc (FCR) en células mieloides para la defensa del organismo contra agentes infecciosos, en este trabajo se procedió a determinar el posible papel inductor de IL-1 de las dos formas hasta ahora descritas (alfa y beta), en la expresión de receptores Fc en macrófagos y granulocitos normales de la cavidad peritoneal de ratón a través de la técnica de formación de rosetas con eritrocitos activados con anticuerpos.

Los resultados obtenidos demuestran que tanto IL-1 alfa como IL-1 beta inducen la expresión de FcR en macrófagos residentes, pero no en granulocitos; además se aportan evidencias de que estos receptores son de tipo I y II. Por otro lado, tomando en consideración que Interferon gama (IFN $\gamma$ ) ha sido descrito como inductor de FcR en este tipo de células, se procedió a evaluar si ambos tipos de factores compartían el mismo mecanismo de inducción. Nuestros resultados indican que probablemente el mecanismo de inducción de IL-1 e IFN $\gamma$  sean diferentes pues IFN $\gamma$  sólo indujo receptores Fc del tipo I en los macrófagos y granulocitos. Además se examina la posibilidad de que el inductor de Receptores Fc producido por células macrofágicas, descrito anteriormente (FcRI), e IL-1 sean la misma molécula ya que se obtuvo que el medio condicionado de macrófagos que contiene FcRI es inhibido por el anticuerpo anti-IL-1.

Finalmente, se discute la posible utilización de IL-1 como un agente profiláctico para individuos con alto riesgo de infección, así como terapéutico en problemas de inmunodepresión, ya que su capacidad de inducir receptores para Fc proporciona a los leucocitos, encargados de la defensa inmune contra cuerpos extraños, la capacidad de fagocitarlos y destruirlos.

## INTRODUCCION

La producción de células sanguíneas que se lleva a cabo en la médula ósea a través del proceso de hematopoyesis es regulada por un grupo de factores de crecimiento hematopoyético conocidos como Factores Estimuladores de Colonias (CSFs, del inglés Colony Stimulating Factors), que intervienen en los procesos de proliferación y diferenciación de las células mieloides (1).

Dentro del grupo de células sanguíneas, los macrófagos y granulocitos se constituyen como tipos celulares muy importantes ya que a través de sus capacidades fagocíticas participan de manera relevante en los mecanismos de defensa del organismo (2). Para que estos tipos celulares lleven a cabo adecuadamente sus funciones es necesario que se encuentren diferenciados y una característica de diferenciación muy importante en éstos, es la expresión de receptores para la fracción cristalizable de las inmunoglobulinas (FcR), los cuales se encuentran involucrados en los procesos de eliminación de agentes extraños o patógenos (3).

A pesar de que durante algún tiempo se pensó que los CSFs eran los únicos responsables de inducir las propiedades de diferenciación que caracterizan a una célula madura, recientemente se han descrito moléculas diferentes a los CSFs que inducen la diferenciación de células mieloides; entre

estas moléculas se encuentran el Factor de Crecimiento Transformante, el Interferon gama y el Inductor de Receptores Fc (4-6), que comparte características muy similares con Interleucina 1.

El presente trabajo se llevó a cabo con la finalidad de determinar el papel de Interleucina 1 en la inducción a la expresión de FcR en macrófagos y granulocitos de la cavidad peritoneal de ratón.

## MARCO TEORICO

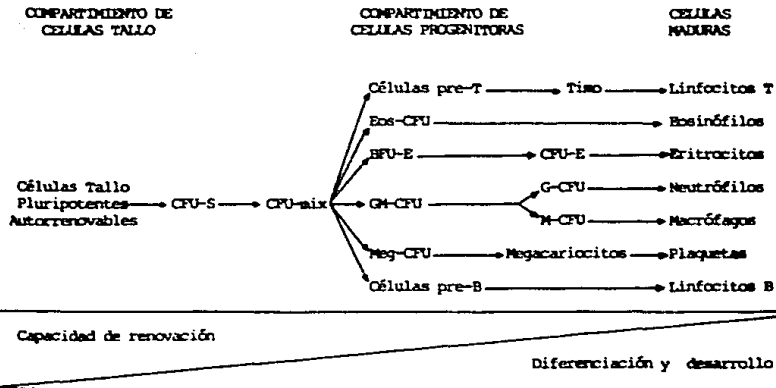
### HEMATOPOYESIS Y FACTORES DE CRECIMIENTO

La sangre es un tejido constituido por líquido y elementos formes; el líquido es el plasma sanguíneo y los elementos formes las células sanguíneas (7).

Entre los componentes celulares de la sangre se incluyen distintos tipos celulares especializados como los eritrocitos o glóbulos rojos, relacionados con el transporte de oxígeno; las plaquetas, involucradas en los procesos de coagulación y los leucocitos o glóbulos blancos (linfocitos, granulocitos, monocitos y macrófagos) que intervienen en las respuestas inmunes e inflamatorias (8,9).

Debido a que la mayoría de las células sanguíneas tienen un promedio de vida muy corto, los diferentes tipos de células maduras que aparecen en la corriente sanguínea son producidas de manera continua en la médula ósea a través del proceso conocido como hematopoyesis (10). Este proceso es gobernado por una compleja red de factores reguladores y múltiples interacciones celulares que permiten mantener una elevada tasa generacional de células maduras así como la adaptación de la producción de células sanguíneas a las necesidades del organismo; por ejemplo, aumentar la producción de granulocitos durante una infección (11).

FIGURA 1  
 DIAGRAMA GENERAL DEL PROCESO HEMATOPOYETICO



CFU-S: Unidades Formadoras de Colonias del Bazo; CFU-mix: Células multipotenciales con capacidad de producir colonias in vitro que contienen células de varios linajes mieloides; GM-CFU: Células bipotentes capaces de producir tanto macrófagos como neutrófilos, estas células dan origen a precursores de neutrófilos (G-CFU) y de macrófagos (M-CFU); BFU-E: Células eritroides que proliferan in vitro para producir CFU-E, las cuales responden a eritropoyetina y dan origen a los eritrocitos maduros; Eos-CFU: Células que originan colonias de eosinófilos; Meg-CFU: Células progenitoras de plaquetas; todo esto ocurre en la médula ósea. Las células pre-T migran al timo donde proliferan y se desarrollan en linfocitos T maduros insumo activos. Las células pre-B se desarrollan en la médula ósea y originan linfocitos B maduros.

Tomado de: Dexter TM, 1989. (Ref.135)



En relación al origen de las células sanguíneas, se ha demostrado la existencia de una célula precursora común para todos los tipos celulares sanguíneos; esta célula, que tiene una gran capacidad de autorrenovación se conoce como célula tallo pluripotencial (12). Estas células progenitoras fueron identificadas por primera vez en experimentos de reconstitución, donde se transplantaban células normales de médula ósea a ratones letalmente irradiados, en los que después de 8 o 9 días se observaba la formación in vivo de colonias en el bazo. A la población de células tallo pluripotenciales, responsables de la formación de estas colonias se les llamó operacionalmente Unidades Formadoras de Colonias de Bazo (CFU-S, del inglés Colony Forming Unit-Spleen) (13).

A partir de las CFU-S se originan las células tallo multipotenciales o Unidades Formadoras de Colonias Mixtas (CFU-mix, del inglés Colony Forming Units Mixed) las que al proliferar y dependiendo de las condiciones de cultivo darán origen a los precursores de los distintos tipos celulares sanguíneos. Cabe señalar que a medida que una célula precursora se diferencia, ésta se ve disminuida en su capacidad proliferativa (14). En la figura 1 se esquematiza un diagrama general de la hematopoyesis.

Actualmente se sabe que los procesos de multiplicación y diferenciación de las células sanguíneas requieren de mecanismos reguladores que mantengan el equilibrio entre el número de células indiferenciadas y el

de células maduras (1).

Una parte de estos mecanismos reguladores está dada por los factores de crecimiento hematopoyético (15), que son producidos tanto por células mieloides como no mieloides (16). Otros mecanismos reguladores están representados por eventos bioquímicos y moleculares intracelulares y factores externos como las interacciones célula-célula, componentes de la matriz extracelular y señales fisicoquímicas humorales (17). Entre los factores de crecimiento se encuentra una familia de glicoproteínas conocidas como Factores Estimuladores de Colonias (CSFs, del inglés, Colony Stimulating Factors). Entre estos, los cuatro mejor caracterizados son el Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF, del inglés Granulocyte-Colony Stimulating Factor) y el Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos (M-CSF, del inglés Macrophage-Colony Stimulating Factor); relativamente específicos para los precursores de los linajes granulocítico y monocítico respectivamente; el Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF, del inglés Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor) y la Interleucina 3 (IL-3), los cuales actúan sobre células precursoras que dan origen a granulocitos, monocitos, eosinófilos, megacariocitos, basófilos y eritrocitos, bajo las condiciones de cultivo adecuadas (18,19). Además de estos factores, se encuentra la Eritropoyetina (EPO), que regula la producción de eritrocitos (20).

Recientemente se ha demostrado que otros factores también son capaces de actuar sobre precursores hematopoyéticos por ejemplo, Interleucina 1 (IL-1) que actúa sinérgicamente con algunos CSFs para estimular la proliferación de células tallo multipotenciales (21). De la misma forma, se ha demostrado que Interleucina 4 (IL-4) junto con diferentes CSFs puede aumentar o disminuir la formación de colonias por parte de células progenitoras (22). Por otro lado, Interleucina 6 (IL-6) puede mejorar la proliferación de precursores dependientes de IL-3 (23) y finalmente, se ha reportado que Interleucina 5 (IL-5) actúa como un estimulador específico de la formación de colonias de eosinófilos (24). En la figura 2 se esquematiza el nivel al que actúan estos factores durante el desarrollo de las células mieloides.

#### MACROFAGOS

La reacción a cambios en el balance homeostático inducidos por una infección es caracterizada por una serie de eventos muy complejos, pero cuidadosamente orquestados. Las células involucradas en este proceso se comunican entre ellas y/o con el ambiente celular por medio de redes multidireccionales de señales biológicas (interacciones célula-célula, producción de modificadores biológicos), que inducen, amplifican o suprimen respuestas

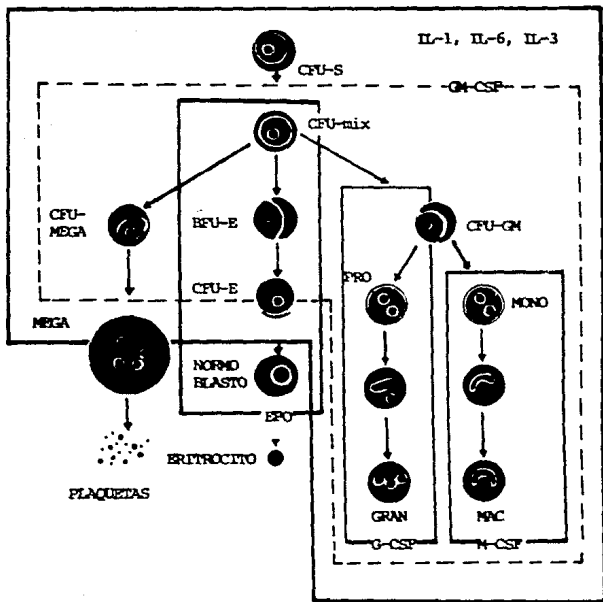


Figura 2. Regulación del desarrollo de células mieloides por factores de crecimiento hematopoyético. (IL), Interleucina; (CFU), Unidad Formadora de Colonias; (MEGA), megacariocitos; (E), Eritrocitos; (PRO), Promielocito; (MONO), Monoblasto; (GRAN), Granulocito; (MAC), Macrófago.  
Tomado de: Gabrilove JL, 1989. (Ref.136)

particulares. Entre las células involucradas en este proceso, se encuentra una célula muy importante: el macrófago, que junto con los monocitos circulantes, forman el sistema fagocítico mononuclear, que es considerado como uno de los sistemas fagocíticos celulares más importantes del organismo (25,26).

Filogenéticamente, los fagocitos mononucleares son células muy primitivas, ya que células homólogas a éstas pueden encontrarse en formas de vida muy primitivas y un simple protozooario como una amiba, tiene una gran similitud con el macrófago de un mamífero (26). Ontogénicamente el macrófago tiene su origen en los islotes sanguíneos del saco vitelino durante la etapa embrionaria (10), pero hay evidencias de que en adultos, los macrófagos y también los granulocitos se derivan de una célula progenitora común en la médula ósea (27). Este precursor común (identificado in vitro únicamente) es conocido como Unidad Formadora de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CFU, del inglés Granulocyte Macrophage-Colony Forming Unit) debido a su capacidad para originar colonias de macrófagos y granulocitos en cultivos de médula ósea (28). A partir de la GM-CFU, los fagocitos mononucleares forman una línea celular que se inicia con el monoblasto; en ratón, la duración del ciclo celular del monoblasto es de casi 12 h y esta célula, por división, da origen a dos promonocitos, los cuales son los primeros precursores de los fagocitos mononucleares morfológicamente

identificables (27,29).

El promonocito es una célula de aproximadamente 10 a 18  $\mu$  de diámetro, tiene un aparato de Golgi bien desarrollado y contiene gránulos de peroxidasa; presenta una capacidad fagocítica poco desarrollada y pocos receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas G, esta célula también se divide una vez (con un ciclo celular de 16 h) y origina a dos monocitos (27,29).

El monocito maduro tiene un diámetro aproximado de 12 a 20  $\mu$  y presenta generalmente un núcleo ovalado o en forma de herradura; el nucléolo no se observa y la cromatina no está muy condensada; el citoplasma es grisáceo o azulado y ocasionalmente presenta vacuolas con gránulos de peroxidasa (30). Hasta este momento, desde el monoblasto hasta el monocito, se han formado cuatro tipos celulares diferentes; sin embargo, en la médula ósea ya no se llevan a cabo más divisiones de este tipo y los monocitos abandonan al azar la médula ósea, para dirigirse a sangre periférica, dentro de las 24 h después de que han sido formados (31).

Los monocitos permanecen en circulación durante un tiempo aproximado de 17 h y después dejan este compartimiento para llegar finalmente a los tejidos donde madurarán hacia macrófagos (31).

Los macrófagos representan el estado final de maduración de los monocitos (32). Estas células tienen un diámetro de 20 a 80  $\mu$  y se caracterizan por poseer un núcleo vesicular

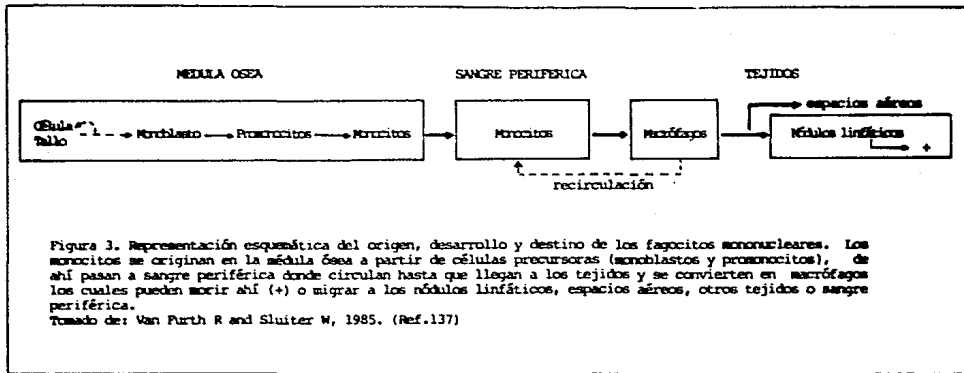
grande con múltiples nucléolos; el citoplasma es abundante y con gran cantidad de gránulos, poseen también mitocondrias grandes y vacuolas digestivas que contienen materiales muy diversos (33,34). La figura 3 muestra una representación esquemática del desarrollo de los macrófagos.

Desde el punto de vista funcional, las actividades de los fagocitos mononucleares se centran en 5 áreas principales:

1) Participan en la defensa del organismo contra microorganismos. Estas células no sólo actúan como iniciadores de la inmunidad específica (mediada por anticuerpos), y la inmunidad inespecífica (independiente de anticuerpos), sino que también como células efectoras en la eliminación de agentes patógenos una vez que se ha establecido el proceso inmunológico (25).

Las reacciones citotóxicas de los macrófagos son numerosas y entre los efectores citotóxicos a través de los cuales llevan a cabo estas reacciones se incluyen las enzimas lisosomales y una amplia variedad de productos tóxicos secretados al medio extracelular como proteasas, especies reactivas de oxígeno, prostaglandinas, peroxidasa y factores del sistema del complemento (35).

2) Son los principales elementos celulares involucrados en la eliminación de células dañadas, senescentes o muertas; metabolizan además restos orgánicos y eliminan materiales inorgánicos (26).





3) Participan en interacciones celulares bidireccionales con los linfocitos, los cuales son importantes en las funciones inmunes humorales y celulares (36).

4) Producan materiales bioactivos importantes en la regulación de otras funciones celulares; entre estos factores se incluyen Factores Estimuladores de Colonias, factores del complemento, factores activadores de linfocitos y prostaglandinas (35).

5) Son también importantes en el control de neoplasias, pues pueden activarse y hacerse citotóxicas contra células tumorales (37).

La habilidad de los macrófagos para participar en estas funciones no es constitutiva sino que se adquiere en respuesta a señales extracelulares; este proceso de desarrollo se conoce como activación y se define como la adquisición de la capacidad para llevar a cabo funciones citolíticas. De manera general, la activación de los macrófagos produce un aumento o disminución de las capacidades bioquímicas y fisiológicas requeridas para la ejecución de ciertas funciones en particular (38). De esta forma, durante la respuesta inmune los macrófagos sufren un amplio rango de cambios entre los que se incluye niveles altos de ciertos componentes de la membrana celular como receptores para la fracción cristalizante de las inmunoglobulinas (FcR, del inglés Fc Receptor) y aumento en la capacidad fagocítica, de adherencia y en la secreción de enzimas (32,34).

## GRANULOCITOS

Los granulocitos o células polimorfonucleares, considerados como el segundo sistema fagocítico celular del organismo, se originan al igual que los macrófagos, de la célula precursora GM-CFU (28). Los mieloblastos, considerados las células más primitivas del linaje granulocítico se derivan de la GM-CFU. Estas células se caracterizan por poseer un núcleo redondo o ligeramente ovalado con uno o más nucléolos y de tamaño grande en relación con el citoplasma. Este último se tiñe de color intenso y no presenta inclusiones citoplasmáticas (39). A partir de los mieloblastos se originan los promielocitos, células relativamente grandes (15  $\mu$ ) con un núcleo muy similar al de los mieloblastos pero reconocidas por sus prominentes gránulos citoplasmáticos (gránulos azurófilos) que contienen peroxidasa y que se tiñen de un color morado intenso (40).

Conforme estas células maduran y dan origen a los mielocitos, las granulaciones pierden sus propiedades azurofílicas, se hacen neutrofilicas y son teñidas tanto por colorantes ácidos como básicos. Estas granulaciones son específicas para neutrófilos y permiten distinguir a éstos de otros granulocitos (eosinófilos y basófilos) que se caracterizan por sus propios gránulos (41).

Posteriormente, los mielocitos originan a los metamielocitos, considerados como los precursoras inmediatos de los granulocitos maduros. Los metamielocitos

son células que ya no se dividen y que son fácilmente reconocibles por su núcleo indentado o en forma de herradura y sus múltiples gránulos neutrofilicos. Finalmente, la forma madura típica, que es precedida por una célula con núcleo en forma de banda, presenta un núcleo multilobulado y denso y un citoplasma pálido con finos gránulos violetas (38). En la figura 4 se esquematiza el desarrollo de las células granulocíticas.

En cuanto a su funcionalidad, el papel principal de los granulocitos es la localización y eliminación de microorganismos. Para ello, el granulocito, primero debe alcanzar el sitio de la infección (a través de quimiotáxis), después ingerir al microorganismo (fagocitosis) y finalmente, eliminarlo o evitar su replicación (muerte del microorganismo).

La fagocitosis, que se ilustra en la figura 5, es el proceso de ingestión de una partícula por una célula. Durante este proceso, el granulocito hace contacto con la partícula, este contacto puede ser mediado a través de receptores  $Fc$  de la membrana del granulocito que reconocen las inmunoglobulinas que cubren a la partícula; después de esto, la superficie de la membrana se invagina y engloba a la partícula formando una vacuola a la cual se fusionan diversos gránulos de la célula, descargan sus contenidos enzimáticos y destruyen a la partícula. Finalmente las enzimas digieren a la partícula dentro de la célula (43).

Médula ósea (desarrollo en 14 días)

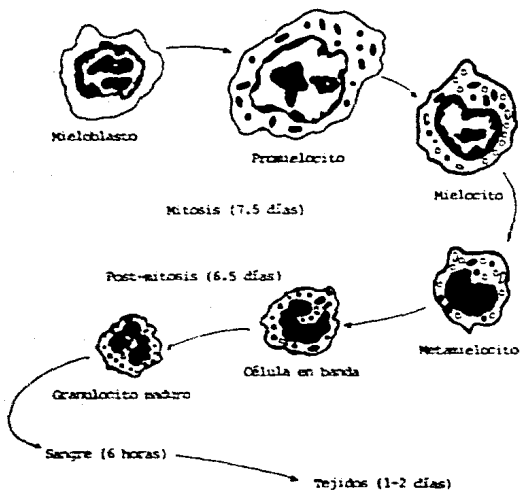


Figura 4. Representación de las etapas de maduración de las células granulocíticas. Tomado de: Cline MJ, 1975 (Ref.39)

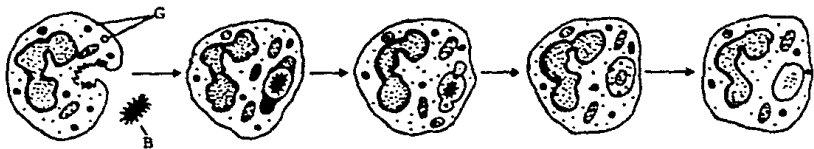


Figura 5. Representación del proceso fagocítico. Una partícula opsonizada, por ejemplo una bacteria (B), es reconocida por los receptores Fc de la membrana celular del granulocito. Posteriormente, la célula invagina su membrana y la partícula es englobada en una vacuola fagocítica. Algunos gránulos (G) de la célula se fusionan con la vacuola y descargan sus contenidos. Finalmente la partícula es muerta y digerida.

Tomado de: Cline MJ, 1975 (Ref. 43)

## INTERLEUCINA 1

Es conocido que los monocitos y macrófagos juegan papeles muy importantes en la regulación de diferentes funciones celulares debido a que producen y liberan una gran cantidad de productos cuando son estimulados por sustancias como los lipopolisacáridos. Entre los productos secretados por los macrófagos se encuentran los componentes del sistema del complemento, factores de coagulación, múltiples enzimas, inhibidores de enzimas y citocinas, proteínas de la matriz extracelular, hormonas, compuestos reactivos de oxígeno y nitrógeno y algunas citocinas muy importantes (44). Tabla 1.

Las citocinas son transmisores de las comunicaciones célula-célula en muchos procesos fisiológicos y de hecho se ha sugerido que estas proteínas plurifuncionales actúan como mediadores y moduladores de procesos biológicos esenciales, principalmente aquellos relacionados con el crecimiento y la diferenciación celular (45). Una de estas citocinas es Interleucina 1 (IL-1).

La identidad "real" de IL-1 ha sido un tema controversial durante muchos años y debido a esto, se han atribuido actividades biológicas parecidas a las de IL-1 a diferentes moléculas derivadas de una gran cantidad de tipos celulares (46).

Los primeros estudios sobre IL-1 datan de 1953 cuando, Bennet y Besson (47) describieron un material pirogénico producido por leucocitos activados que llamaron Pirogénico

## TABLA 1

### PRODUCTOS SECRETADOS POR MACROFAGOS

#### HORMONAS POLIPEPTIDICAS

Interleucina 1, Factor de Necrosis Tumoral, Interferón alfa, Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas, Factor de Crecimiento de Fibroblastos, factores activadores de fibroblastos, Factor de Crecimiento Transformante, Timosina, Eritropoyetina, Factores Estimuladores de Colonias de Granulocitos y Macrófagos, Factor Activador de la monocitopoyesis, Beta-endorfina, Hormona Adrenocorticotropica, Factor Activador de Neutrófilos.

#### COMPONENTES DEL COMPLEMENTO

Componentes C1, C4, C2, C3, C5 de la ruta clásica; Factor B, factor D y properdina de la ruta alternativa; inactivador del componente C3

#### FACTORES DE COAGULACION

Protrombina, Factores IX, X, V y VII, Protrombinasa, Activador plasminógeno y su inhibidor, inhibidores de la plasmina

#### ENZIMAS

Múltiples proteasas, lipasas, enzimas lisosomales e hidrolasas así como sus inhibidores.

#### PROTEINAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

Fibronectina, proteínas de enlace, proteoglicanos.

#### OLIGOPEPTIDOS BIOACTIVOS

Glutación

#### LIPIDOS BIOACTIVOS

Prostaglandinas, tromboxanos.

#### HORMONAS ESTEROLES

#### PURINAS

#### INTERMEDIARIOS REACTIVOS DE ORIGENO

#### INTERMEDIARIOS REACTIVOS DE NITROGENO

Tomada de: Nathan CF, 1987 (Ref. 44)

Endógeno (EP, del inglés Endogenous Pyrogen). Más tarde, en 1972, Gery y Waksman (48) describieron una molécula, producida por macrófagos peritoneales de ratón, que aumentaba la proliferación de timocitos en respuesta a dosis subóptimas de nitógenos como la Concanavalina A y la Fitohemaglutinina, ellos llazaron a esta molécula Factor Activador de Linfocitos (LAF, del inglés Lymphocyte Activating Factor).

En 1974 el grupo de Murphy (49), llevando a cabo la caracterización del EP, demostró que esta molécula tenía un peso molecular de 14 a 17 kilodaltones (kD). Al mismo tiempo, Dinarello y su grupo describieron 2 formas de EP producidas por monocitos humanos, una con un punto isoeléctrico (pI) de 5 y la otra de 7 (50).

De esta manera, IL-1 ha sido referida en la literatura por diferentes nombres, los cuales describen diferentes actividades de esta proteína; algunos sinónimos de IL-1 incluyen: Pirógeno Leucocítico, Mediador Endógeno Leucocítico, Factor de Proliferación de Timocitos, Proteína Mitogénica, Factor Reemplazante de células T, Factor Activador de células B, Factor Diferenciador de células B, Factor de células Mononucleares, Factor Activador de Osteoclastos y Factor Inductor de la Proteólisis de Músculo; sin embargo, en 1979, los inmunólogos decidieron nombrar a todos estos factores, en base a sus similitudes biológicas y bioquímicas, IL-1 (51).



A pesar del avance de los estudios anteriores, las controversias sobre IL-1 comenzaron a resolverse por completo cuando en 1984, Lomedico et al (52); describieron, en la línea celular murina de tipo macrófago P388D.1, la clonación de un tipo de IL-1 de pI de 5; poco después, Auron et al (53) aislaron, en monocitos de sangre periférica humana, el DNA complementario que codificaba para el precursor de IL-1, este precursor de 31 aminoácidos, incluía los aminoácidos contenidos en la IL-1 de 17 kD y pI de 7. Posteriormente, en 1985, March y su grupo (54) aislaron 2 DNAs complementarios de células macrófagicas humanas que codificaban para proteínas con actividad de IL-1. Estas dos moléculas, actualmente conocidas como IL-1 alfa (IL-1  $\alpha$ ) e IL-1 beta (IL-1  $\beta$ ), muestran una gran homología con la forma murina de pI 5 y con la humana de pI 7, respectivamente (54).

Finalmente, en células humanas se han secuenciado los genes que codifican para ambas proteínas, estos genes se hallan localizados cerca de la región 2q 14 del brazo largo del cromosoma 2 y las proteínas para las cuales codifican (IL-1  $\alpha$  e IL-1  $\beta$ ) sólo muestran de 20 a 30 % de homología (46,55,56). Esta homología se da en 5 regiones (llamadas de la A a la E) las cuales pueden representar los sitios activos de la molécula y muy probablemente, la región C (aminoácidos 150-162) y la D (aminoácidos 165-186) contengan los sitios mínimos de reconocimiento para su receptor (57).

Las dos formas de IL-1 son inicialmente sintetizadas como péptidos precursores de 31 kD (271 aminoácidos para IL-1 $\alpha$  y 259 para IL-1 $\beta$ ), pero debido a rupturas de estos péptidos con proteasas de serina (58), las formas maduras de 17 kD constan de 159 aminoácidos (del 113 al 271 en IL-1 $\alpha$ ) y 153 aminoácidos (del 117 al 269 en IL-1 $\beta$ ) (59).

A pesar de que la forma de 17 kD es la más común, se han descrito péptidos con actividad de IL-1 de pesos moleculares de 2, 4, y 10 kD (considerados como productos de la ruptura proteolítica de la molécula de 17 kD), hasta péptidos de 75 kD (los cuales que representarían una forma agregada de la molécula); estos péptidos han sido aislados de monocitos humanos, plasma y orina (60-62).

Una característica interesante de IL-1 es que carece de la secuencia hidrofóbica característica de las proteínas de secreción, de manera que, no es claro el mecanismo a través del cual IL-1 es llevada fuera de la célula. Algunas evidencias tales como la ausencia de IL-1 en el retículo endoplasmático y su presencia en el citosol y fracciones lisosomales, hacen suponer que IL-1 está asociada y es liberada a través de vesículas lisosomales (63).

Por otra parte, a través de estudios de determinación específica de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por las técnicas de Western Blot, inmunoprecipitación y radioinmunoensayo, se han aportado evidencias de que al menos en células mononucleares humanas, IL-1 $\alpha$  permanece asociada a la membrana (64), mientras que IL-1 $\beta$  es liberada al medio

extracelular (65,66). Estos hallazgos indican que IL-1 $\alpha$  muy probablemente puede desencadenar una respuesta inmune local estimulando a los linfocitos a través de interacciones célula-célula; mientras que IL-1 $\beta$  preferencialmente ejerce efectos sistémicos una vez que es liberada por la célula y entra en la circulación (67).

Otra característica muy interesante de IL-1 es que a pesar de que sus dos formas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) muestran una baja homología, ambas compiten por el mismo receptor en diversos tipos celulares tales como monocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y B (68). Este receptor fue purificado en la línea de células T EL4 de ratón, pesa 80 kD en su forma glicosilada y está formado de tres dominios: uno extracelular de 319 aminoácidos, uno transmembranal de 21 y uno citoplasmático de 217. Algo de gran importancia es que este receptor pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (69,70). Además de este receptor, inicialmente considerado el único, se han descrito otras proteínas de enlace para IL-1, algunas de las cuales presentan una afinidad mucho mayor que el receptor originalmente descrito (71); se piensa que estas proteínas puedan representar un segundo tipo de receptores o que sean, debido a los diferentes pesos moleculares que presentan, productos de la ruptura o agregación del receptor de 80 kD (70). De hecho, recientemente se ha demostrado que las células B expresan un receptor que es distinto al que se presenta en células T y fibroblastos; este receptor es más

pequeño, no tiene reactividad cruzada y a pesar de que se une con las dos formas de IL-1, las afinidades de enlace relativas son diferentes a las que se presentan en las células antes mencionadas; por estas razones se considera que estos receptores son productos de genes diferentes (72).

En cuanto a su producción, inicialmente se consideró que las células fagocíticas activadas eran las principales productoras de IL-1, pero actualmente se sabe que esta molécula es sintetizada por monocitos de sangre periférica, macrófagos alveolares, peritoneales y de bazo, células de Kupffer y células de médula ósea. Además, algunos tipos celulares no fagocíticos como los fibroblastos, queratinocitos, osteoclastos, astrocitos, células B, células asesinas naturales (NK), microgliales, corneales, gingivales, epiteliales, endoteliales, de Langerhans y de músculo liso también producen IL-1; existen evidencias de que prácticamente todos los tipos celulares nucleados producen IL-1 (46,73, 74). Sin embargo, se considera que los monocitos y macrófagos son la fuente principal de IL-1 debido al alto número en que se presentan estas células en el organismo, a su habilidad para producir grandes cantidades de esta molécula y a su capacidad para procesar y secretar a los precursores de IL-1 de una manera más efectiva que otros tipos celulares (73).

La producción de IL-1 es estimulada por inductores inmunológicos entre los que se incluyen linfocitos T activados, complejos inmunes, productos microbiales,

levaduras, virus y lectinas, así como agentes inflamatorios (73). Probablemente las endotoxinas, en particular la molécula de lípido A (componente activo de los lipopolisacáridos), sean los activadores más potentes de la producción de IL-1 en los fagocitos mononucleares (75).

La información que se ha generado sobre IL-1 ha permitido considerar a ésta como una molécula altamente pleiotrópica, debido a que se le han atribuido más de 50 efectos biológicos en diferentes tejidos y tipos celulares y además se ha demostrado que esta molécula no es especie-específica sino que puede cruzar con diferentes sistemas biológicos (59). Algunos de los efectos de IL-1 se listan en la tablas 2 y 3.

La mayoría de las actividades de IL-1 muestran una característica común, todas son parte del complejo grupo de respuestas conocido como respuesta de fase aguda, que lleva a cabo el organismo ante invasiones microbiales, reacciones inmunológicas y procesos inflamatorios. Finalmente, el hecho de que IL-1 se haya conservado a lo largo del proceso evolutivo sugiere que su función esencial es la de actuar como un orquestador de los mecanismos adaptativos del individuo (75).

Actualmente la investigación en torno a IL-1 se ha dividido en dos grandes campos: uno donde se estudian los potenciales efectos benéficos de IL-1 en los mecanismos de defensa del organismo; y otro, donde se buscan las maneras de bloquear la producción y/o actividad de IL-1, pues muchas de

TABLA 2

EFFECTOS IN VIVO DE INTERLEUCINA 1

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Inducción de fiebre  
Síntesis de prostaglandina E2  
Incremento en la producción de adrenocorticotropinas  
Disminución del apetito

EFFECTOS HEMATOLOGICOS

Neutrofilia  
Estimulación de los progenitores hematopoyéticos  
Incremento en la producción de Factores Estimuladores de Colonias

EFFECTOS METABOLICOS

Producción de proteínas de fase aguda  
Disminución de la síntesis de albúmina  
Aumento de los niveles de zinc y hierro  
Incremento en la producción de insulina  
Incremento en la excreción de sodio

SISTEMA VASCULAR

Hipotensión y shock  
Producción de prostaglandinas  
Aumento de la adherencia de leucocitos  
Disminución de la resistencia vascular

Tomada de: Schindler R, and Dinarello CA, 1990 (Ref.59)

**TABLA 3**  
**EFFECTOS IN VITRO DE INTERLEUCINA 1**

**CRECIMIENTO CELULAR**

Fibroblastos, queratinocitos, células mesangiales, células gliales, células T, células B, precursores hematopoyéticos

**EFFECTOS CITOTOXICOS**

Citotoxicidad para células tumorales, células B de islotes pancreáticos y tirocitos

**EFFECTOS INMUNOLOGICOS**

Inducción de la producción de citocinas activadoras de linfocitos

Activación de células asesinas naturales en sinergismo con Interleucina 2 e Interferones

Inducción de receptores para Interleucina 2

Inducción de la producción de anticuerpos por células B

Quimiotaxis de células T y B

Incremento de la citotoxicidad de macrófagos

Activación de linfocitos T y B

**EFFECTOS INFLAMATORIOS**

Inducción de la síntesis de colagenasa

Resorción de huesos

Inducción de la producción de prostaglandina E2 en fibroblastos, macrófagos y células endoteliales

Liberación de histamina por basófilos y degranulación de eosinófilos

Liberación de tromboxanos por neutrófilos y monocitos

**EFFECTOS EN TEJIDO VASCULAR**

Proliferación de células de músculo

Inducción de la actividad procoagulante y adhesividad de células endoteliales

**EFFECTO SOBRE OTRAS CITOCINAS**

Inducción de la producción de Interleucina 1, 2 y 3, Factor de Necrosis Tumoral e Interferon gama.

Tomada de: Schindler R, and Dinarello CA, 1990 (Ref.59)

sus actividades biológicas están asociadas con procesos patológicos como la degradación de tejidos y la diabetes (70).

#### INMUNOGLOBULINAS

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) son macromoléculas de naturaleza proteica que se encuentran en el suero de los vertebrados superiores; estas moléculas pertenecen al grupo de las  $\gamma$ -globulinas y están representadas por 5 tipos diferentes designados como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (76-78). Estos anticuerpos, a pesar de que muestran diferencias, comparten una estructura básica y propiedades químicas generales muy similares (79).

La principal función de las inmunoglobulinas es unirse específicamente a cuerpos extraños como toxinas, microorganismos, parásitos y células propias dañadas (antígenos) y posteriormente, intervenir en los procesos de inactivación y eliminación de éstos (80).

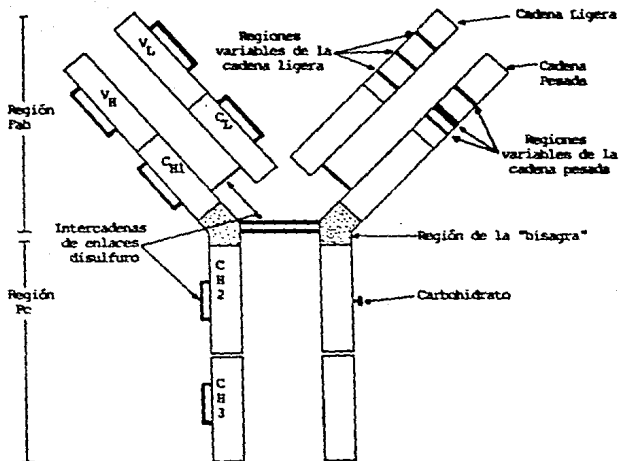
En los mamíferos, la IgG es la inmunoglobulina más importante ya que representa alrededor de un 75% del total de las inmunoglobulinas y es de la que más se conoce sobre su estructura química y funciones biológicas (79).

En cuanto a la estructura de los anticuerpos, en su forma monomérica son macromoléculas formadas por cuatro cadenas. En el caso de la IgG, la molécula se encuentra constituida por dos polipéptidos idénticos de 23 kD, que se conocen como cadenas ligeras (L), y 2 polipéptidos de 53



xD llamados cadenas pesadas (H) (79). Cada una de las cadenas ligeras está unida a una cadena pesada a través de enlaces no covalentes y también por un enlace disulfuro. En esta molécula, los dos pares de cadena ligera-cadena pesada parecen mantenerse unidos a través de puentes disulfuro entre las dos cadenas pesadas (81). De esta manera, la molécula puede representarse en forma de Y (figura 6) con el extremo amino terminal en la parte superior de las cuatro cadenas y el extremo carboxílico terminal de las dos cadenas pesadas en la parte inferior (79). La región de la molécula que incluye los enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas se conoce como región de la "bisagra"; además se pueden encontrar grupos carbohidrato unidos a las cadenas pesadas (82,83).

Algo importante es que al comparar las secuencias de aminoácidos de la mitad amino terminal de las cadenas ligeras de diferentes inmunoglobulinas se encontró que estas secuencias presentaban una marcada variabilidad de una molécula a otra. En contraste, en la mitad carboxílica terminal de estas mismas cadenas ligeras, las secuencias de aminoácidos eran idénticas. Estos dos segmentos de la molécula recibieron el nombre de regiones variables (VL) y regiones constantes (CL) de la cadena ligera respectivamente. Las secuencias de las cadenas pesadas exhiben un patrón similar. La región variable (VH) se inicia en el extremo terminal amino y tiene una longitud similar a la de las regiones VL de la cadena ligera; la región



VL y VH: Regiones variables de las cadenas ligera y pesada.  
 CL y CH: Regiones constantes de las cadenas ligera y pesada.

Figura 6. Representación esquemática de una molécula de inmunoglobulina G.  
 Tomado de: Masserman RL and Capra JD, 1977 (Ref.138)

constante (CH) es unas tres veces más larga (84). Estudios más detallados demostraron que la variabilidad de estas regiones en las cadenas ligeras y pesadas se concentra en 3 segmentos de las regiones que se conocen como regiones hipervariables (85).

El tratamiento de estas moléculas con enzimas como la papaína corta la molécula en 3 fragmentos. Dos de éstos, designados Fab (fracciones de enlace del anticuerpo) contienen las regiones variables y llevan a cabo las funciones de unión con el antígeno. El tercer fragmento, designado Fc (fracción cristalizante) está compuesto de la región constante y lleva a cabo funciones efectoras tales como la unión a los receptores de membrana (86).

Finalmente, debido a que los extremos amino terminales de cada par de cadena ligera-cadena pesada comprenden los sitios de enlace del antígeno, la heterogeneidad en las secuencias de aminoácidos es muy importante ya que contribuye a que se manifieste la gran diversidad de especificidades por los diferentes antígenos con que se enfrenta un individuo durante su vida (79).

## RECEPTORES FC

Uno de los cambios más notables que sufren los macrófagos, tanto in vivo como in vitro, es la activación hasta un estado en el cual adquieren la capacidad de destruir microorganismos o células malignas. Esta activación esta acompañada de cambios biológicos y morfológicos, entre los que se incluye la expresión de ciertos receptores de membrana (87).

Los receptores de membrana llevan a cabo funciones de reconocimiento requeridas para controlar las respuestas a cambios en el microambiente celular (3). Entre los diferentes tipos de receptores que se expresan en la membrana de células fagocíticas, encontramos a los receptores para la fracción cristalizable de las inmunoglobulinas (FCR), quienes proveen un enlace importante entre los componentes humorales (anticuerpos) y celulares (macrófagos, granulocitos, linfocitos) que participan en la respuesta inmune (88), ya que constituyen el sitio específico de la membrana celular capaz de reconocer y enlazar a la fracción cristalizable (Fc) de de las inmunoglobulinas (3).

Los FcR se detectaron por primera vez a inicios de los años 60's en células macrofágicas encontrándose también, que estas células poseen la más alta densidad de estos receptores de entre todos los tipos celulares que toman parte en la respuesta inmune (3,89). A pesar de que se han descrito los FcR específicos para IgM, IgA e IgE (90-92), la mayoría de

los estudios se han enfocado a conocer la biología y bioquímica de los FcR para IgG, debido a que éstos se expresan en un número relativamente alto y a que se encuentran ampliamente distribuidos en múltiples poblaciones celulares (3).

Los FcR han sido descritos en células normales y neoplásicas de diferentes especies incluyendo al humano. Entre los diferentes tipos celulares que expresan FcR se encuentran los linfocitos T y B, células NK, células dendríticas, plaquetas, monocitos, macrófagos y granulocitos (93). Además, también se han encontrado en células y tejidos no relacionados con el sistema inmune tales como placenta, glomérulo renal, saco vitelino, cerebro, espermatozoides, fibroblastos infectados con citomegalovirus y células endoteliales (3,94,95).

El hecho de que los FcR se presenten en una amplia variedad de tipos celulares, sugiere por una parte, que estos pueden desempeñar papeles importantes dependiendo del tipo celular en que se expresen y del estado de diferenciación y por otra parte, que puede encontrarse una marcada heterogeneidad entre estos receptores (3). Actualmente se sabe, a través de estudios de clonación, que existen diferentes tipos de FcR y que éstos pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (93).

En cuanto a su naturaleza química, a pesar de que la mayoría de estudios (de marcaje) indican que estos receptores son moléculas de tipo glicoproteico (96), estudios

de ultracentrifugación y tratamiento enzimático las atribuyen propiedades de lipoproteínas (97). Estructuralmente, estas proteínas de membrana constan de una porción extracelular glicosilada, de un segmento transmembranal y una "cola" citoplasmática que corresponde al extremo carboxi terminal (93). (Figura 7).

A pesar de que los FcR son miembros de la misma familia, estos receptores son muy heterogéneos y pueden ser distinguidos en base a su distribución celular, a su especificidad y afinidad por diferentes isotipos de IgG, a su tamaño molecular y a su reactividad con anticuerpos monoclonales (98).

Es precisamente el desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos para estos receptores y los avances técnicos en el análisis de las moléculas de la superficie celular, lo que ha permitido identificar y caracterizar tres tipos distintos de FcR (conocidos como FcRI, FcRII y FcRIII), además de ayudar a conocer como se expresan y funcionan estos receptores (99,100).

El FcRI (CD 64) en células humanas es una glicoproteína de 70 a 72 kD y es reconocido por los anticuerpos monoclonales 32, 22, 44, 62, 197 (100,101) y 10.1 (102). Este receptor se puede unir con alta afinidad a formas monoméricas de IgG como IgG1 e IgG3 humanas y con IgG2a e IgG3 de ratón (103,104); mientras que los receptores expresados en células de ratón se unen a formas

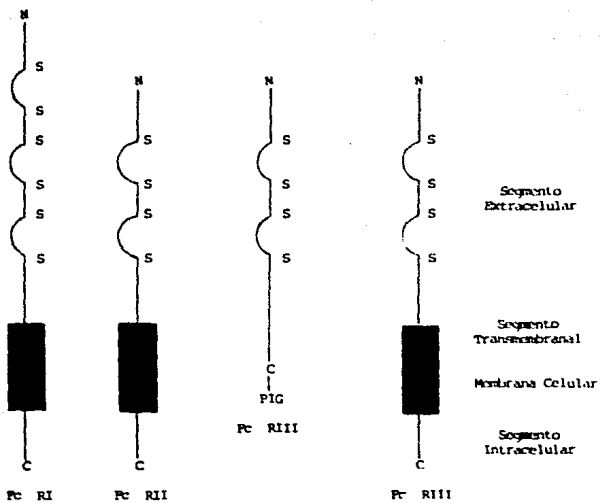


Figura 7. Representación esquemática de los receptores Pz. Se puede apreciar la diferencia entre el receptor tipo III unido a la membrana celular por un enlace fosfatidilinositol glicano (PIG) y el receptor tipo III transmembranal normal.

Tomado de: Kinet JP, 1989 (Ref.93)

monoméricas o agregadas de IgG2a con una alta afinidad a 4°C (105).

La expresión de este receptor está casi restringida a monocitos mononucleares, llegándose a encontrar de 15 000 a 40 000 receptores en monocitos normales de sangre periférica, mientras que los macrófagos tienen más de 50 000 receptores por célula (106). Por otro lado, aunque en granulocitos frescos se pueden encontrar alrededor de 1 000 receptores, el IFN  $\gamma$ , puede incrementar este número entre 5 y 10 veces (107), además, este receptor también se expresa en líneas celulares mieloides humanas como la HL-60, U-937 y THP-1 (108).

El FcRII humano (CDw32) es una glicoproteína de peso molecular de 40 kD (109) que ha sido definido por los anticuerpos monoclonales IV.3 y KuFc79 (110). Este receptor no muestra una afinidad detectable por la IgG monomérica humana (106); sin embargo se une con IgG1 e IgG2 monoméricas de ratón (99) y es específico para complejos inmunes y partículas opsonizadas (101). En células de ratón, estos receptores se unen a formas complejas o agregadas de IgG1, IgG2a o IgG2b (105).

El FcRII se expresa en la superficie de monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y células B, en un número muy similar en estos tipos celulares (106) y aparentemente es el único tipo de receptor Fc que se expresa en plaquetas (111); otros tipos celulares no



hematopoyéticos que expresan este receptor son las células endoteliales y trofoblastos (112).

En base a ensayos funcionales y análisis bioquímicos se han identificado varias formas de FcRII (113). En ratones, se ha observado que este receptor es codificado por dos genes: a y b, y debido a un un rearreglo alternativo, el gen b es codificado en dos formas (93); además, a través de experimentos de clonación de DNA se han identificado al menos 3 moléculas relacionadas que poseen dominios extracelulares idénticos, pero diferentes dominios citoplasmáticos a los del FcRII (101).

El FcRIII (CD 16) en células humanas, fue identificado inicialmente como una glicoproteína que era reconocida por los anticuerpos monoclonales JG8 y B73.1 (114,115). Este receptor se pueda presentar en dos formas diferentes: el FcRIII que en neutrófilos está unido a la membrana a través de un enlace fosfatidilinositol glicano (FcRIII-PI) y presenta un peso molecular de 26 kD (116), mientras que en macrófagos y células NK, este receptor es expresado como una molécula transmembranal (FcRIII-TM), con un peso molecular de 50 a 70 kD (117). En la figura 7 se muestra una representación esquemática de estos receptores.

En células humanas, este receptor tiene una baja afinidad por la IgG monomérica y sólo interactúa con complejos de IgG1 o con partículas opsonizadas (106); mientras que en células de ratón, este receptor tiene una

alta afinidad por IgG3 polimérica (118). El FcRIII se caracteriza por su alto nivel de expresión en neutrófilos (de 100 000 a 200 000 por célula) (114); se expresa también en la superficie de linfocitos granulares, macrófagos y eosinófilos (106).

Desde el punto de vista biológico, la importancia de los FcR es grande, pues a pesar de que sus funciones no son completamente entendidas, se sabe que están involucrados en la mediación de múltiples procesos, tanto de naturaleza efectora como reguladora de la defensa inmune, así como en la integración de los componentes humorales y celulares que participan en la respuesta inmunológica (119). Entre las funciones dependientes de los receptores Fc mejor estudiadas se encuentran la fagocitosis de partículas cubiertas con inmunoglobulinas (120), la eliminación de complejos inmunes (119,121) y la lisis mediada por anticuerpos (Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) de parásitos (122), microorganismos (123) y de algunos tipos celulares malignos (124).

La interacción de los FcR con los complejos inmunes induce una serie de procesos bioquímicos, que llevan a la liberación de sustancias mediadoras de gran actividad biológica (93) como las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, que son moléculas de conocida capacidad reguladora (119). Es entonces a través de estas funciones que las células fagocíticas protegen al individuo de la

infección por microorganismos patógenos, destruyen células tumorales y eliminan complejos inmunes de la circulación (3).

Finalmente, los factores que influyen en la expresión de FcR son numerosos y entre estos se incluyen las condiciones del cultivo, y las hormonas y citocinas en el medio de cultivo (101); de esta manera se ha observado que el IFN $\gamma$ , el fragmento C5a del sistema del complemento, ciertos péptidos quimiotácticos liberados por las bacterias, así como los estímulos capaces de inducir un aumento en los niveles de AMP cíclico incrementan la expresión de FcR y por el contrario, los corticosteroides y los estímulos asociados al aumento del GMP cíclico inhiben su expresión (94).

Debido a que recientemente se ha demostrado que factores diferentes a los CSFs, como el Inductor de Receptores Fc (FcRI, del inglés Fc Receptor Inducer), inducen la diferenciación de células mieloides (macrófagos y granulocitos) mediante la expresión de receptores para Fc y que el FcRI comparte características moleculares muy similares (peso molecular y punto isoeléctrico) con IL-1, uno de los objetivos del presente trabajo fue evaluar el posible efecto de IL-1 en la inducción de receptores Fc en macrófagos y granulocitos normales de ratón, y proporcionar mediante ello evidencias de que la IL-1 y el FcRI pudieran ser la misma molécula.

Por otro lado tomando en consideración que los macrófagos secretan IL-1, otro de nuestros objetivos consistió en evaluar si estas células eran capaces de autoinducirse para la expresión de receptores para Fc. Es conocido que también el INF induce la expresión de FcR y que esta inducción es exclusiva para el tipo I, consideramos por tanto interesante evaluar si la IL-1 induce el mismo tipo de receptor o si era capaz de inducir el de tipo II. Finalmente tomando en consideración que existen dos formas de IL-1, y , con propiedades biológicas muy semejantes, procedimos a evaluar si ambas formas de IL-1 tienen el mismo tipo de propiedades de inducción de FcR.

#### OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de Interleucina 1 en la expresión de receptores Fc en macrófagos y granulocitos de ratón.

#### OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si el Inductor de Receptores Fc e Interleucina 1 son la misma molécula.
  
- Determinar si Interleucina 1 alfa induce la expresión de Receptores Fc en macrófagos residentes y granulocitos de la cavidad peritoneal de ratón.
  
- Determinar si Interleucina 1 beta induce la expresión de Receptores Fc en macrófagos residentes y granulocitos de la cavidad peritoneal de ratón.
  
- Determinar el tipo de Receptores Fc que induce cada factor, tanto en macrófagos residentes como granulocitos de la cavidad peritoneal de ratón.

## MATERIALES Y METODO

### MATERIAL BIOLÓGICO

En este trabajo se emplearon ratones hembras o machos de la cepa CD-1 (ENEP-Zaragoza) de 4 a 6 semanas de edad (30 a 35 gr de peso). Los ratones se utilizaron como fuente de macrófagos residentes y granulocitos de la cavidad peritoneal.

### OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS RESIDENTES

Para la obtención de macrófagos residentes de cavidad peritoneal, se sacrifican los ratones por dislocación cervical. Muerto el ratón, se retira la piel de la zona peritoneal; las células de la cavidad se obtienen lavando ésta con 10 ml de una solución amortiguadora de Fosfatos (SAF) fría y recuperando posteriormente este volumen. Durante el proceso de obtención de las células, estas deben mantenerse en un tubo cónico de plástico frío contenido en un recipiente con hielo, para evitar la adherencia de las células a las paredes del tubo. El lavado peritoneal se repite por lo menos dos veces con la finalidad de obtener el mayor número posible de células.

Las células colectadas se lavan 3 veces (centrifugación a 500 g durante 5 min) con Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM, Sigma, St. Louis Mo. USA), posteriormente, se resuspenden en un volumen conocido y se procede a evaluar el número celular. Con la finalidad de purificar la población

y trabajar únicamente con macrófagos, las células ( $6 \times 10^5$ ) se incuban durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$  en MEM con lo cual se permite la adherencia de macrófagos. Finalmente se retira el sobrenadante con las células no adherentes.

#### OBTENCION DE GRANULOCITOS

Para obtener granulocitos de la cavidad peritoneal, se inyectan 2 ml de una solución estéril de caseinato de sodio (Laboratorios Difco, Michigan USA) al 10% en SAF por vía intraperitoneal a los ratones necesarios. Después de 16 h, se sacrifican los ratones por dislocación cervical y se lava la cavidad peritoneal dos veces con 10 ml de SAF. Las células obtenidas se lavan 3 veces con MEM, se cuentan para ser sembradas. Con la finalidad de purificar la población, se siembran las células ( $6 \times 10^6/\text{ml}$ ) en cajas Petri de 5 ml y se incuban durante 3 h; transcurrido este periodo de tiempo, se colecta el sobrenadante y las células contenidas en éste se lavan, se cuentan y se repite una vez más el periodo de incubación. Transcurrido este tiempo, se colecta nuevamente el sobrenadante de las cajas de cultivo, se lavan las células y se cuentan para finalmente sembrarlas. Esta técnica permite obtener una población celular formada por granulocitos (los macrófagos se eliminan cuando estos se adhieren a las cajas de cultivo) del tipo neutrófilos, que son con los que se llevó a cabo este trabajo.

## CULTIVO CELULAR

Todos los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Forma Scientific, USA) bajo una atmósfera con 10% de CO<sub>2</sub> a 37°C y una humedad relativa del 95%. Como medio de cultivo se utilizó MEM suplementado con 10% de Suero de Caballo (SC, Lab. Dif. Cel y Canc., Mexico), previamente desactivado a 56°C durante 30 min. A este medio de cultivo también se le agregó estreptomycin (100 U/ml) y penicilina (100 U/ml) con la finalidad de evitar contaminación con bacterias. También se agregaron 3.7 g/l de bicarbonato de sodio para mantener el pH fisiológico de 7.2 en los cultivos en presencia de CO<sub>2</sub>. Finalmente, este medio de cultivo se esterilizó por filtración con membranas de 0.22 μ (Millipore, USA).

En los ensayos de macrófagos residentes se cultivaron  $6 \times 10^5$  células ( $3 \times 10^6$  cel/ml) en placas de 96 micropozos de 200 μl (Nunclon, Dinamarca) y se mantuvieron en cultivo durante 2 días; en el caso de los granulocitos, se sembraron  $5 \times 10^5$  células por micropozo ( $2.5 \times 10^6$  cel/ml) y se mantuvieron en cultivo durante 24 h. Los inductores que se emplearon (Medio condicionado, 20 μl; Interferon γ, 100 y 50 U/ml para macrófagos y granulocitos respectivamente e Interleucina 1α y β, 1 ng/ml) se agregaron al principio del cultivo.



#### PREPARACION DE MEDIOS CONDICIONADOS POR MACROFAGOS RESIDENTES ESTIMULADOS CON LIPOPOLISACARIDOS

Se obtienen macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón y se siembran  $8 \times 10^6$  células en cajas Petri de 5 ml con MEM suplementado al 10% con SC. Los macrófagos se estimulan con 1 ng/ml de lipopolisacáridos de Salmonella Typhimurium (Sigma, St. Louis Mo, USA). Las células se mantienen en cultivo durante 4 días y transcurrido este tiempo, se colecta el sobrenadante, siendo este el Medio Condicionado, el cual es utilizado como fuente del Inductor de Receptores Fc (FCRI).

#### ERITROCITOS ACTIVADOS

Previamente se obtiene sangre de carnero y se diluye ésta en una cantidad proporcional de solución de Alsever, los eritrocitos así obtenidos se almacenan a 4°C hasta su uso; por otro lado, se hace una dilución 1:1600 de inmunoglobulina G (IgG) de conejo dirigida contra eritrocitos de carnero (Laboratorios Cordis, Florida, USA) en SAF; esta solución se almacena a -20°C hasta su uso. Para sensibilizar a los eritrocitos con anticuerpo, se lavan 0.25 ml de estos 3 veces con SAF (centrifugación a 500 g durante 5 min); posteriormente se agrega 1 ml de IgG diluida, se resuspenden los eritrocitos y se incuban durante 30 min a 37°C. Después del periodo de incubación, se lavan los eritrocitos 3 veces con SAF y finalmente se resuspenden en 2 ml de SAF. De esta manera se obtienen los eritrocitos

activados (EA); estos eritrocitos se almacenan a 4°C hasta su uso, sin exceder de 4 días.

#### **EVALUACION DE RECEPTORES Fc**

Para evaluar la expresión de receptores Fc en macrófagos y granulocitos se empleó la técnica de rosetas con EA, a partir de la cual se conoce el porcentaje de células que expresan FcR. (125).

Después de transcurridos los respectivos periodos de incubación en presencia de los diferentes inductores, se verifica la ausencia de contaminación. Si los cultivos se encuentran en buen estado, en el caso de los granulocitos, estos se centrifugan a 300 g durante 5 min y se les elimina el sobrenadante; se les agregan despues 200 µl de MEM fresco y 20 µl de EA, se resuspenden las células y se centrifugan a 300 g durante 5 min para que se de la formación de un botón que contiene EA y granulocitos; inmediatamente después se incuba a 37°C durante 30 min.

En el caso de los macrófagos, quienes están adheridos al sustrato de cultivo, el sobrenadante puede eliminarse sin una centrifugación previa. Posteriormente se agregan 200 µl de MEM fresco y se despegan las células refrigerando la placa de cultivo a 4°C durante 5 o 10 min; a continuación se agregan 20 µl de EA, se resuspenden las células y también se centrifugan al igual que los granulocitos para posteriormente incubarlos durante 30 min a 37°C.

Transcurrido el periodo de incubación, las células se

resuspenden y se toman muestras que se colocan en un hemocitómetro (Clay Adams, USA) para proceder a evaluar el porcentaje de rosetas en un microscopio compuesto (Carl Zeiss, Germany). Se considera una roseta a aquella célula (macrófago o granulocito) que muestra eritrocitos adheridos en su membrana; las rosetas pueden ser débiles si muestran de 3 a 10 eritrocitos unidos a la membrana celular o fuertes si presentan más de 10 eritrocitos unidos.

#### **EMPLEO DE ANTICUERPOS ANTI-FcR PARA LA DETERMINACION DE LOS TIPOS DE RECEPTORES INDUCIDOS POR LAS DIFERENTES CITOCINAS**

Después del periodo de cultivo de los macrófagos o granulocitos, se agregan 20  $\mu$ l de anticuerpos (Medarex, USA) anti-FcRI o anti-FcRII (0.3  $\mu$ g/ml) a micropozos en los cuales se habían adicionado los diferentes inductores al principio del cultivo. Las células se incuban durante 30 min y se realiza la técnica de rosetas para determinar los tipos de receptores que son expresados. La concentración de anticuerpos que se utiliza es 3 veces mayor a la requerida para saturar los receptores que normalmente se expresan en una célula sin tratamiento con citocinas.

#### **EMPLEO DE ANTICUERPOS ANTI-INTERLEUCINA 1**

Para determinar si el Inductor de Receptores Fc (FcRI) presente en el MC e IL-1 eran la misma molécula, se utilizaron anticuerpos anti-IL-1 $\alpha$  y anti-IL-1 $\beta$  (Immunex,

Seattle WA, USA). Considerando que 10  $\mu$ l de una dilución 1:200 de estos anticuerpos, son capaces de neutralizar 1 ng/ml de citocina, se utilizaron 20  $\mu$ l de esta dilución de anticuerpos en los ensayos de inhibición de. Estos anticuerpos se adicionaron junto con el medio condicionado desde el inicio del cultivo y transcurrido el periodo de incubación se llevo a cabo la técnica de rosetas.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en una campana de cultivo bajo condiciones de esterilidad.

#### CITOCINAS

En este trabajo se empleó Interferon gama (IFN $\gamma$ ) recombinante de ratón con actividad de  $4.5-9 \times 10^6$  U/mg, Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) recombinante humana e Interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ) recombinante de ratón, ambas con actividad de  $1 \times 10^8$  U/mg (Genzyme, Boston MA, EU). Se utilizó también IL-1 $\beta$  recombinante humana con actividad de  $1 \times 10^8$  U/mg (Immunex, Seattle WA, EU). Estos productos recombinantes se obtienen a través de técnicas de ingeniería genética, transfectando el gen que codifica para una determinada proteína en bacterias o levaduras.

#### EVALUACIONES

Se realizaron por lo menos 3 ensayos independientes por duplicado para cubrir cada objetivo. Los resultados que se muestran son el promedio del porcentaje de rosetas que se obtiene con cada factor en los diferentes ensayos y su

desviación estándar. En cada una de las muestras se contaron por lo menos 100 células.

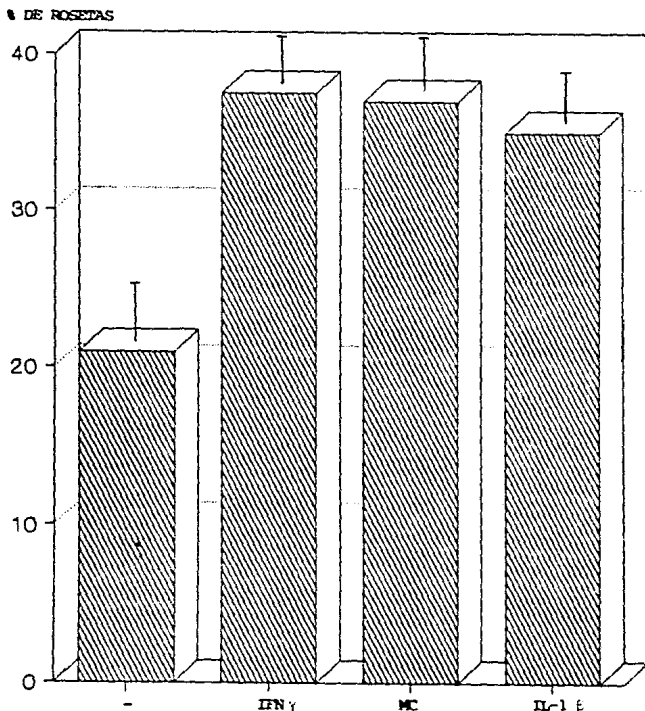
## RESULTADOS

### EL MEDIO CONDICIONADO POR MACROFAGOS RESIDENTES INDUCE LA EXPRESION DE RECEPTORES Fc EN MACROFAGOS RESIDENTES.

Estudios previos en nuestro laboratorio habían demostrado que el medio condicionado por macrófagos residentes (MC) contenía una molécula que inducía la expresión de receptores Fc (FcR) en células de médula ósea (6); esta molécula se conoce como Inductor de Receptores Fc (FcRI, del inglés Fc Receptor Inducer). Con la intención de determinar si estos medios inducían el mismo efecto en células fagocíticas maduras, se cultivaron  $6 \times 10^5$  macrófagos residentes de cavidad peritoneal de ratón en presencia de 20  $\mu$ l de MC (6) durante 2 días. Se utilizaron también 1 ng/ml de Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), de la que se ha reportado induce la expresión de FcR en macrófagos (126), y 100 U de Interferon gama (IFN $\gamma$ ) como controles positivos (5). Se realizó también un cultivo sin inductores el cual en este trabajo se considera como control negativo.

Los resultados obtenidos (Gráfica 1) muestran que el MC, al igual que IL-1 $\beta$  y el IFN $\gamma$ , inducen de manera semejante la expresión de FcR en los macrófagos residentes, desde un 20% de rosetas en el control negativo hasta casi un 40% con los 3 inductores.

EFFECTO DEL MEDIO CONDICIONADO POR MACROFAGOS RESIDENTES E INTERLEUCINA 1 BETA EN LA EXPRESION DE RECEPTORES Fc EN MACROFAGOS RESIDENTES.



Gráfica 1. Expresión de receptores Fc en macrófagos residentes de cavidad peritoneal de ratón durante dos días de cultivo. (-), Control negativo sin inductores; (IFN  $\gamma$ ), Interferón gama; (MC), Medio Condicionado por macrófagos residentes estimulados con LPS, (IL-1  $\beta$ ), Interleucina 1 beta.

**EFFECTO DE INTERLEUCINA 1 ALFA EN LA EXPRESION DE RECEPTORES  
Fc EN MACROFAGOS RESIDENTES**

IL-1 se presenta en dos formas moleculares diferentes: IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Aunque las dos formas muestran algunas diferencias (la más importante, el punto isoeléctrico), se ha descrito que llevan a cabo las mismas actividades biológicas (59). Con la finalidad de evaluar si IL-1 $\alpha$ , al igual que IL-1 $\beta$  induce la expresión de RFC en macrófagos residentes, se cultivaron  $6 \times 10^5$  macrófagos en presencia de 1 ng/ml de IL-1 $\alpha$  o de IL-1 $\beta$ , se utilizaron también cultivos con 100 U de IFN $\gamma$  así como sin inductores como controles positivo y negativo respectivamente.

Los resultados (Gráfica 2) muestran que IL-1 $\alpha$ , en forma semejante al IFN $\gamma$  y a la IL-1 $\beta$ , induce la expresión de FcR en macrófagos residentes (31, 33 y 32% respectivamente) en comparación con el control negativo (18%).

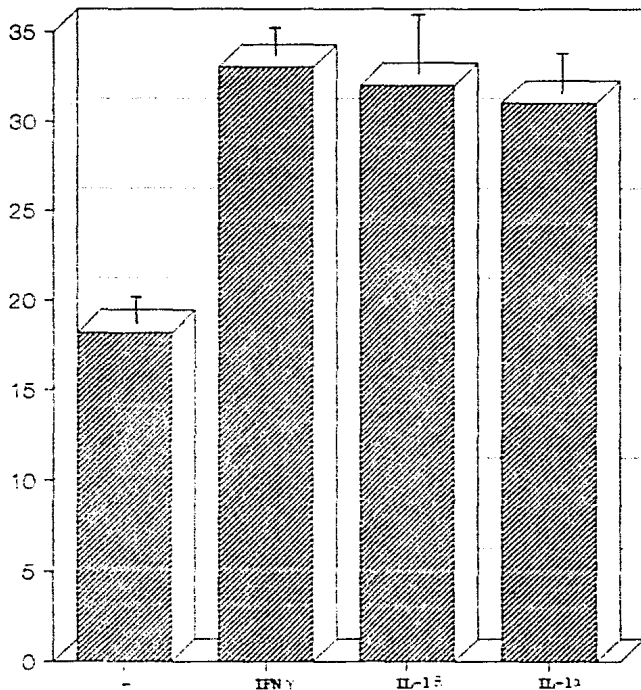
**TIPO DE RECEPTORES Fc INDUCIDOS POR INTERLEUCINA 1 ALFA  
INTERLEUCINA 1 BETA EN MACROFAGOS RESIDENTES**

Una vez que se demostró que IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  inducen en forma semejante la expresión de RFC en macrófagos residentes, se procedió a evaluar los tipos de RFC que inducen estas citocinas. Con este propósito, se cultivaron  $6 \times 10^5$  macrófagos durante dos días en presencia de 1 ng/ml de IL-1 $\alpha$  o IL-1 $\beta$ . Como en ensayos anteriores, se utilizó IFN $\gamma$  (100 U) como control positivo y un cultivo sin inductores como control negativo. Después de dos días de cultivo, se



EFFECTO DE INTERLEUCINA 1 ALFA EN LA EXPRESION DE RECEPTORES Fc  
EN MACROFAGOS RESIDENTES DE CAVIDAD PERITONEAL DE RATON.

% DE ROSETAS



Gráfica 2. Expresión de receptores Fc en macrófagos residentes de cavidad peritoneal de ratón durante dos días de cultivo en presencia de diferentes inductores. (-), Control negativo sin inductores ; (IFN  $\gamma$ ), Interferón gamma; (IL-1  $\beta$ ), Interleucina 1 beta; (IL-1  $\alpha$ ) Interleucina 1 alfa.

adicionaron durante 30 min, los anticuerpos anti-FcRI o anti-FcRII a los cultivos con las interleucinas y el IFN $\gamma$  para posteriormente proceder a la evaluación de FcR.

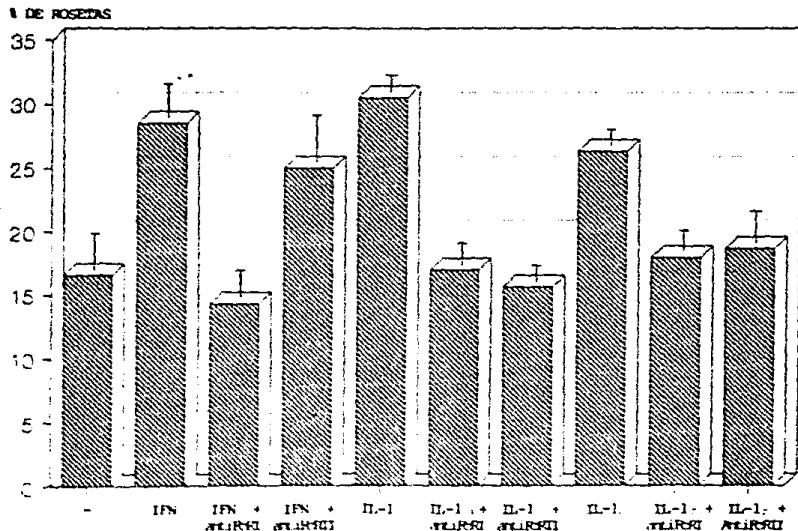
Los resultados obtenidos muestran tal y como se había demostrado previamente (4,5), que IFN $\gamma$  induce principalmente la expresión de FcR (28%) tipo I (FcRI), ya que solamente se observó una disminución considerable en el porcentaje de rosetas cuando se utilizó anti-FcRI (14%). Con el anticuerpo anti-FcRII, se observó también una disminución en el porcentaje de rosetas pero esta fue de poca magnitud (25%). En cuanto a IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , cuando se emplearon los anticuerpos anti-FcRI y anti-FcRII se observó una disminución considerable en el porcentaje de rosetas (porcentajes muy similares a los del control negativo, 17 y 15% para IL-1 $\alpha$  y 18 y 19% para IL-1 $\beta$ ) en ambos casos. En consecuencia podemos decir que las dos formas de IL-1 inducen la expresión tanto de FcRI como de FcRII y que posiblemente los mecanismos a través de los cuales el IFN $\gamma$  e IL-1 inducen la expresión de FcR en estas células macrofágicas sean diferentes (Gráfica 3).

**EVIDENCIAS DE QUE EL INDUCTOR DE RECEPTORES Fc PRESENTE EN  
EL MEDIO CONDICIONADO POR MACROFAGOS RESIDENTES ES**

**INTERLEUCINA 1.**

Tomando en cuenta que la caracterización molecular del Inductor de Receptores Fc (FcRI), contenido en el medio condicionado por macrófagos residentes (MC) reveló que

TIPO DE RECEPTORES Fc INDUCIDOS POR INTERLEUCINA 1 ALFA Y BETA E INTERFERON GAMA EN MACRÓFAGOS RESIDENTES DE RATÓN.



Gráfica 1. Expresión de receptores Fc en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal en presencia de diferentes inductores, durante dos días de cultivo. (-), Control negativo sin inductores; (IFN), Interferón gama; (IL-1), Interleucina 1 alfa; (IL-1 -), Interleucina 1 beta; (anti Fc), Anticuerpo anti receptor Fc.

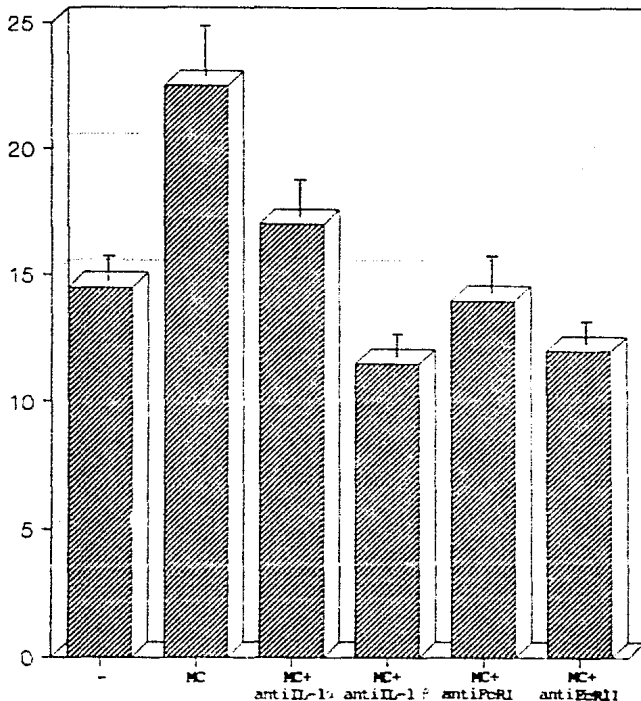
esta molécula presenta características muy similares a las de IL-1, tales como el peso molecular y punto isoeléctrico, además de que ambas moléculas son producidas por macrófagos (6); se procedió a determinar si FcRI e IL-1 pudieran ser la misma molécula. Con esta finalidad se utilizaron anticuerpos dirigidos contra IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (anti-IL-1) en cultivos con 20  $\mu$ l de MC en presencia de  $6 \times 10^5$  macrófagos residentes durante dos días para evaluar si el efecto inductor del IFCR era inhibido por un anticuerpo monoclonal contra IL-1.

La evaluación de la expresión de FcR mostró que con ambos anticuerpos se produjo una disminución en el porcentaje de rosetas (17% con anti-IL-1 $\alpha$  y 11% con anti-IL-1 $\beta$ ) a diferencia de cuando sólo se usó el MC (22%, con 17% en el control negativo) en los cultivos (Gráfica 4); esto quiere decir que la disminución es mayor cuando se utiliza el anticuerpo anti-IL-1 $\beta$ .

Para determinar el tipo de receptores que inducía el MC, se agregaron los anti-FcRI y anti-FcRII a cultivos en los que se había agregado MC como inductor. Los resultados obtenidos muestran que en ambos casos se produce una disminución en el porcentaje de rosetas, con valores muy semejantes al control negativo (14, 12 y 14% respectivamente).

EL INDUCTOR DE RECEPTORES P<sub>ε</sub> CONTENIDO EN EL MEDIO CONDICIONADO POR MACRÓFAGOS RESIDENTES, ES INTERLEUCINA 1.

■ DE ROSETAS



Gráfica 4. Expresión de receptores P<sub>ε</sub> en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón durante dos días de cultivo en presencia de Medio Condicionado por macrófagos residentes. (-), Control negativo sin inductores; (MC), Medio Condicionado por macrófagos residentes; (antiIL-1), Anticuerpo anti Interleucina 1, (antiP<sub>ε</sub>RI), anticuerpo anti Receptor P<sub>ε</sub>.

EFFECTO DE INTERLEUCINA 1 ALFA E INTERLEUCINA 1 BETA EN LA  
EXPRESION DE RECEPTORES Fc EN GRANULOCITOS DE LA CAVIDAD  
PERITONEAL DE RATON

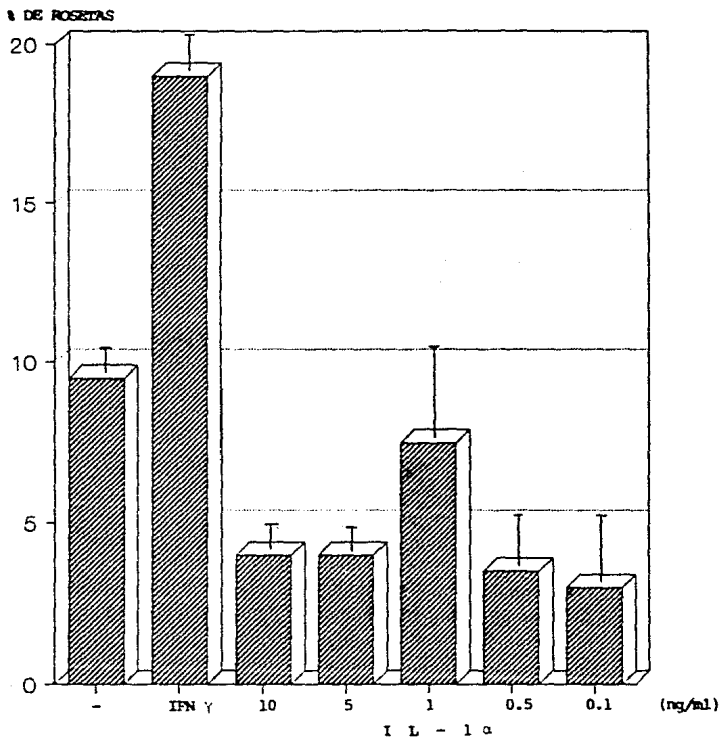
Debido a que los granulocitos o polimorfonucleares participan en la eliminación de parásitos y microorganismos (a veces mediadas a través de FcR), estos son considerados como el segundo sistema fagocítico celular más importante del organismo (43).

Tomando como antecedentes que tanto IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  inducen la expresión de FcR del tipo I y II en macrófagos residentes, se consideró interesante evaluar si estas dos citocinas podían inducir el mismo efecto en otro tipo de célula fagocítica como lo son las granulocíticas. Con esta finalidad, se cultivaron  $5 \times 10^5$  granulocitos en presencia de 1 ng/ml de IL-1 $\alpha$  o IL-1 $\beta$  durante 24h; también se cultivaron granulocitos en presencia de 50 U de IFN $\gamma$  y granulocitos sin inductor como controles positivo y negativo respectivamente.

Cuando se evaluó la expresión de FcR, se observó que únicamente IFN $\gamma$  aumentaba considerablemente el porcentaje de rosetas con respecto al control negativo (de 9% hasta casi 20%); en el caso de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , se pudo observar que estas citocinas no inducían la expresión de FcR, ya que los porcentajes de rosetas obtenidos con estos factores (6 y 7% respectivamente) eran muy similares a los del control negativo (9%) (Gráficas 5 y 6).

Tomando en consideración que la dosis utilizada no haya

EFFECTO DE INTERLEUCINA 1 ALFA EN LA EXPRESION DE RECEPTORES P<sub>c</sub> EN GRANULOCITOS DE CAVIDAD PERITONEAL DE RATON.

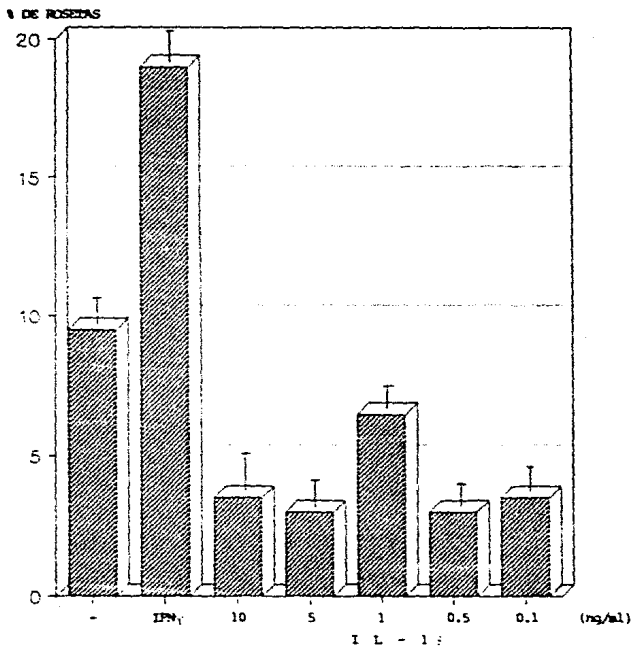


Gráfica 5. Efecto de diferentes concentraciones (ng/ml) de Interleucina 1 en la expresión de receptores P<sub>c</sub> en granulocitos de cavidad peritoneal de ratón durante un día de cultivo. (-), Control negativo sin inductores; (IFN $\gamma$ ), Interferón gama, control positivo; (IL-1 $\alpha$ ), Interleucina 1 alfa.

sido la adecuada para poder inducir la expresión de FcR en granulocitos, se procedió a probar con concentraciones mayores y menores de esta molécula. Se realizaron en consecuencia cultivos con 10, 5, 0.5, 0.1 ng/ml tanto de IL-1<sub>α</sub> como de IL-1<sub>β</sub>. Los porcentajes de rosetas (no mayores de 4% con las diferentes dosis de las dos citocinas) que se obtuvieron con estas concentraciones indican que muy probablemente ni IL-1<sub>α</sub> ni IL-1<sub>β</sub> inducen la expresión de FcR en los granulocitos; estos datos pueden representar evidencias de que los mecanismos de inducción de FcR por parte de IFN e IL-1 posiblemente sean diferentes (Gráficas 5 y 6).



EFECTO DE INTERLEUCINA 1 BETA EN LA EXPRESION DE RECEPTORES P<sub>2</sub>-URACIL...  
 GRANULOCITOS DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATON.



Gráfica 6. Efecto de diferentes concentraciones de IL-1 (ng/ml) en la expresión de receptores P<sub>2</sub> en granulocitos de la cavidad peritoneal de ratón durante un día de cultivo. (-), Control negativo sin inductores; (IPN: ), Interferón gamma, control positivo; (IL-1: ), Interleucina 1 beta.

## DISCUSION

Se considera hoy en día que los procesos de proliferación y diferenciación de las células mieloides son regulados por una familia de glicoproteínas conocidas como Factores Estimuladores de Colonias (CSPs). Estos factores (GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-3 y EPO, entre otros) actúan sobre las células precursoras para dar origen a tipos celulares específicos (18-20,23). Por otro lado, se ha demostrado que estos factores pueden modular las actividades de estas células induciendo en ellas características de diferenciación importantes para la realización de funciones específicas (18).

Durante algún tiempo se consideró que los CSPs eran los únicos responsables de inducir todas las características de diferenciación en células mieloides; sin embargo, el avance alcanzado en la biología molecular ha permitido disponer de técnicas adecuadas para caracterizar otras moléculas diferentes a los CSPs que desempeñan papeles importantes en el proceso de maduración de estas células.

Hace aproximadamente 15 años se describió una molécula diferente a los CSPs que influía en la activación de los macrófagos, esta molécula recibió el nombre de Factor Inhibidor de Macrófagos (MIF, del inglés Macrophage Inhibiting Factor) y a partir de entonces, se describieron diferentes factores activadores de macrófagos (127), sin embargo, la caracterización molecular de éstos permitió

establecer que se trataban de una misma molécula, que recibió el nombre de Interferon gama (IFN $\gamma$ ). En consecuencia, una gran cantidad de investigadores propone que IFN $\gamma$  es el único responsable de los cambios que ocurren a los macrófagos durante la activación inmunológica (128). A pesar de lo anterior, la activación de los macrófagos, hasta un estado en el cual muestran niveles altos de ciertos componentes de la membrana celular, como antígenos Ia y Receptores Fc (que les permiten eliminar células tumorales o agentes patógenos), no es un fenómeno simple y es muy difícil pensar que éste sea regulado únicamente por una sola molécula; de hecho, se han descrito algunos factores activadores de macrófagos, tanto en sistemas humanos como murinos, que son fisicoquímica y biológicamente diferentes al IFN (129,130).

En este trabajo se presentan evidencias de que Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) puede actuar como un factor activador de macrófagos, pues se demuestra que esta citocina es capaz de inducir la expresión de Receptores Fc (FcR), los cuales constituyen un elemento importante en los mecanismos de defensa del organismo contra agentes infecciosos o patógenos (3).

Por otro lado, aportamos fuertes evidencias de que el Inductor de Receptores Fc (FcRI, que muestra características muy similares a las de IL-1) contenido en el Medio Condicionado por macrófagos residentes (MC) e IL-1 posiblemente sean la misma molécula. Esta observación se basa en el hecho de que cuando se utilizaron los anticuerpos anti-

IL-1 $\alpha$  y anti-IL-1 $\beta$  junto con el MC en cultivos de macrófagos residentes, se obtuvo una disminución en la expresión de FcR hasta valores muy semejantes a los del control negativo. La disminución que se observó en forma más significativa con el anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  está de acuerdo con informes recientes de que la forma  $\beta$  es la principal forma de IL-1 que es liberada por los macrófagos cuando estos son estimulados con lipopolisacáridos de paredes bacterianas (63).

Tomando en consideración nuestros resultados y el hecho de que los macrófagos son capaces de secretar IL-1, se puede especular que estas células puedan autoinducirse a expresar FcR. Si en realidad sucede de esta forma, el papel de IL-1 en el desencadenamiento de las respuestas inmunes no solamente se limitaría a la activación de los linfocitos T y B tal y como se había descrito originalmente para esta molécula (48), sino que también se encargaría de activar a los propios macrófagos induciéndolos a expresar FcR y de esta manera hacer más efectiva la eliminación de los complejos antígeno-anticuerpo, que es un proceso fundamental de defensa del organismo contra cuerpos extraños (Figura 8).

Por otro lado, creemos interesante hacer notar que el requerimiento de dos productos génicos que llevan a cabo prácticamente las mismas funciones, como es el caso de

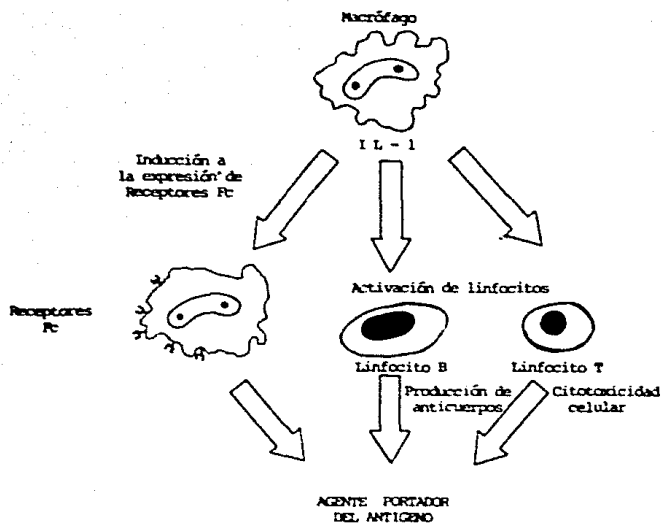


Figura 8. El macrófago produce Interleucina 1 (IL-1) que activa a los linfocitos T para desarrollar la respuesta inmune celular y a los linfocitos B a producir anticuerpos; por otra parte, IL-1 actúa sobre el propio macrófago para que este exprese receptores Fc (autoinducción) y de esta manera la eliminación del agente portador del antígeno sea más efectiva.

IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , parecería ser algo redundante desde el punto de vista evolutivo (131). Esta situación ha llevado a suponer que las dos moléculas pudieran llevar a cabo actividades diferenciales en los diversos procesos biológicos en que intervienen. Aunque algunos estudios han mostrado que entre IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se presentan diferencias de actividad, solamente en algunos cuantos casos las diferencias han sido notables y de hecho, existe una gran cantidad de evidencias experimentales (132) que indican que las dos formas de IL-1 llevan a cabo generalmente las mismas funciones. Esto finalmente ha llevado a proponer que las principales diferencias entre IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  puedan darse a nivel de la regulación diferencial de los genes que codifican para estas proteínas, dependiendo de las señales de inducción y/o el microambiente fisiopatológico (131,132). Lo anterior apoya nuestros datos en los cuales se observó un comportamiento muy semejante de las dos formas de IL-1 en la inducción a la expresión de FcR tanto en células macrofágicas como granulocíticas.

Además de que hemos demostrado que tanto IL-1 $\alpha$  como IL-1 $\beta$  inducen la expresión de FcR en macrófagos, en este trabajo también se pudo determinar que estos receptores son del tipo I y II. En trabajos previos se había demostrado que el IFN $\gamma$  inducía la expresión de FcRI pero no FcRII (5) en células del linaje monocito-macrófago (lo cual se pudo comprobar en este trabajo), además de que consideramos

importante mencionar que a través de este tipo de receptores se llevan a cabo los mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (123). En consecuencia, aún cuando el conocer que tipo de receptores induce IL-1 representa un avance, sería de gran interés el determinar el papel de estos receptores inducidos por IL-1 en los mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

En este trabajo también se evaluó el efecto de IL-1 e IL-1 $\beta$  en la inducción de FcR en células granulocíticas, las que debido a sus funciones de protección contra microorganismos son consideradas como un importante sistema fagocítico celular del organismo (43). Se sabe que los granulocitos expresan normalmente un FcRIII que no es transmembranal, sino que está unido a la membrana celular a través de un enlace fosfolipídico (fosfatidilinositol glican) y que pueden ser inducidos por el IFN  $\gamma$  a expresar FcRI (107,116). Nuestros resultados mostraron que únicamente el IFN inducía la expresión de FcR de manera significativa en estas células. Estos resultados parecen indicar que existe una cierta especificidad de las diferentes citocinas (IFN e IL-1) por las células blanco. Podríamos suponer por ejemplo que debido al avanzado estado de diferenciación de los granulocitos, estos no pudieran ser inducidos a expresar FcR por parte de IL-1. Por otra parte, se sabe que IL-1 induce la liberación de enzimas de tipo lipasas como la lipoproteína lipasa y la fosfolipasa (44) de manera que, los bajos

porcentajes de rosetas obtenidos con las dos formas de IL-1, también podrían deberse a que estas enzimas estuvieran rompiendo los enlaces a través de los cuales se unen los FcRIII a la membrana celular y de esta forma se produjera la disminución en el porcentaje de rosetas que se observó como técnica para evaluar FcR en este trabajo.

Un aspecto importante de nuestros resultados estriba en la diferencia en la actividad de IFN $\gamma$  e IL-1 en cuanto a la inducción a la expresión de FcR en los dos tipos celulares evaluados. En el caso de las células macrofágicas, se pudo determinar que IFN $\gamma$  induce solamente FcRI y que IL-1 induce tanto FcRI como FcRII. Estos resultados probablemente están indicando que existen diferencias en los mecanismos a través de los cuales cada uno de los factores induce la expresión de FcR en estos dos tipos celulares. Sin embargo, no hay que perder de vista que otra posible explicación consistiría en que se presenten diferencias de afinidad entre los receptores que son inducidos por cada uno de los dos factores y que por tanto la determinación de estos a través de los anticuerpos que se utilizaron sea difícil de evaluar o determinar.

La importancia de haber encontrado que Interleucina 1 induce la expresión de FcR en células macrofágicas creemos que pueda tener relación con su posible uso terapéutico. Es bien conocido que los padecimientos leucémicos, que se



caracterizan por una escasa diferenciación de las células mieloides, constituyen un problema de salud muy importante en nuestro país. Estas enfermedades se presentan con alta frecuencia y ocupan el primer lugar de las enfermedades neoplásicas entre la población masculina (133). En consecuencia, consideramos que el hecho de que IL-1 induzca la diferenciación de células mieloides a través de incrementar la expresión de receptores Fc es de gran importancia, sobre todo si tomamos en cuenta que la administración de IL-1 mejora la sobrevivencia de ratones inoculados con dosis letales de bacterias (134), lo cual hace considerar a IL-1 como una potencial herramienta terapéutica en el tratamiento de individuos susceptibles a infecciones (pacientes con leucemia, otros tipos de cáncer o inmunodeprimidos). Además se podría considerar la aplicación profiláctica de IL-1 en individuos expuestos a infecciones como en investigación médica o en hospitales.

A partir de lo anterior se considera importante continuar con este trabajo probando el efecto de IL-1 en células humanas y llevando a cabo ensayos in vivo en ratones, ya que la relación que se ha establecido entre la alteración de la expresión de los receptores Fc y desórdenes de tipo inmunológico, ha hecho que la investigación en torno a los mecanismos de expresión de estos receptores se conviertan en problemas centrales de la inmunología. Es indudable que el avance que se logre en el entendimiento de los mecanismos

básicos de diferenciación y en el conocimiento e identificación de los factores involucrados en estos procesos, permitirán desarrollar agentes terapéuticos para el tratamiento de algunos desórdenes inmunológicos que desgraciadamente no tienen hoy en día esperanzas de curación.

## CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir que:

- Interleucina 1 alfa e Interleucina 1 beta inducen la diferenciación de los macrófagos a través de inducir la expresión de Receptores Fc.
- Interleucina 1 alfa e Interleucina 1 beta inducen la expresión de Receptores Fc tipo I y II en macrófagos.
- Estas dos moléculas no inducen la diferenciación de células granulocíticas.
- Interleucina 1 y el Inductor de Receptores Fc posiblemente sean la misma molécula.

## REFERENCIAS

1. Sachs L, Lotem J. 1984. Haematopoietic growth factors. *Nature* 312:407.
2. Griffin FM. 1982. Mononuclear cell phagocytic mechanisms and host defense. In: *Advances in Host Defense Mechanisms* Vol 1. Gallin JI, Fauci AS (eds). Raven Press New York. 31.
3. Ross GD, Newman SL. 1984. Regulation of macrophage functions by complement receptors and IgG-Fc receptors. In: *The reticuloendothelial system. A comprehensive treatise.* Vol 6. Immunology. Bellanti JA, Herscovitz HB (eds). Plenum Press New York.
4. Welch GR, Wong HL, Wahl SM. 1990. Selective induction of Fc $\gamma$ RIII on human monocytes by Transforming Growth Factor- $\beta$ . *J Immunol* 144:3444.
5. Erbe DV, Collins JE, Shen L, Graziano RF, Fanger MW. 1990. The effect of cytokines on the expression and function of Fc receptors for IgG on human myeloid cells. *Mol Immunol* 27:57.
6. Fragozo A, Arciaga M, Calcagno B, Weiss-Steider B. 1985. Determination of the inducers of Fc (FCRI) and C3 (C3RI) receptor on myeloid cells in several media from human and mouse origin and the identification of the macrophage as the cell that produces these factors. *Exp Hematol* 13:163.
7. Fawcett WMD. 1987. *Tratado de Histologia.* Interamericana, Mc Graw Hill. México. 111-112.
8. Brown BA. 1976. *Hematology: Principles and Procedures.* 2nd ed. Leo & Febiger. Philadelphia, USA. 1.
9. McKenzie SB. 1988. *Textbook of Hematology.* Leo & Febiger. Philadelphia, USA. 2.
10. Moore MA, Metcalf D. 1970. Ontogeny of the haemopoietic system: Yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Brit J Haemat* 18:279.
11. Lowenberg B, Delwel R, Touw I. 1990. Hematopoietic growth factors and progenitor cells in human acute leukemia. In: *Colony Stimulating Factors. Molecular and Cellular Biology.* Dexter TM, Garland JM, Testa NG (eds). Marcel Dekker Inc. New York. 277.
12. Ogawa M, Porter FN, Nakahata T. 1983. Renewal and commitment to differentiation of hemopoietic stem cells. An interpretive review. *Blood* 61:823.
13. Till JE, McCulloch EA. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cell. *Rad Res* 14:213.
14. Metcalf D, Johnson GR. 1978. Mixed hemopoietic colonies in vitro. In *Hematopoietic Cell Differentiation.* Golde DW, Cline MJ, Metcalf D, Fox CF (eds). Academic Press, New York. 141.
15. Pluznik DH, Sachs L. 1966. The induction of clones of normal mast cells by a substance from conditioned medium. *Exptl Cell Res* 43: 553.
16. Zambrano IR, Caceres JR, Mendoza JF, Santiago E, Mora LM,

- Morales MG, Corona MT, Weiss-Steider B. 1989. Evidences that fibroblasts and epithelial cells produce a specific type of macrophage and granulocyte inducer, also known as colony-stimulating factor, and that monocyte-macrophages can produce another factor with proliferative inducing activity on myeloid cells and differentiative activity on macrophages. In: Molecular and Cellular controls of Hematopoiesis. Orlic D (ed). Annals of The New York Academy of Sciences. Vol 554:141.
17. Rich IN. 1988. The macrophage as a production site for hematopoietic regulator molecules: sensing and responding to normal and pathophysiological signals. *Anticancer Res* 8:1015.
18. Metcalf D. 1986. The molecular biology and functions of the Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factors. *Blood* 67:257.
19. Clark SC, Kazan R. 1987. The human hematopoietic Colony-Stimulating Factors. *Science* 236:1229.
20. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EP, Kawakita M, Shimizu T, Miyake T. 1985. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313:806.
21. Moore MAS, Warren DJ. 1987. Synergy of interleukin-1 and granulocyte colony-stimulating factor: in vivo stimulation of stem cell recovery and hematopoietic regeneration following 5-fluorouracil treatment of mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7134.
22. Rennick D, Yang G, Muller-Sieburg C, Smith C, Arai N, Takabe Y, Gemmell L. 1987. Interleukin 4 (B-cell stimulatory factor) can enhance or antagonize the factor-dependent growth of hemopoietic progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:6889.
23. Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, Ihle JN, Hirai Y, Ogawa M. 1987. Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9035.
24. Campell HD, Tucker WQJ, Hort Y, Martinson ME, Mayo G, Clutterback EJ, Sanderson CJ, Young IG. 1987. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding human eosinophil differentiation factor (interleukin 5). *Proc Natl Acad Sci USA* 84:6629.
25. Nacy CA, Belosevic M, Crawford RM, Haely AT, Schreiber RD, Meltzer MS. 1988. Lymphokine regulation of macrophage effector activities. In: *Host Defense Immunomodulation to intracellular pathogens*. Eisenstein TK, Bullock WE, Hanna N (eds). Plenum Press New York. 1.
26. Golde DW, Hocking WG. 1982. Monocyte and macrophage development. In: *Advances in Host Defense Mechanisms Vol 1*. Gallin JI, Fauci AS (eds). Raven Press New York. 13.
27. Cline MJ, Sumner MA. 1972. Bone marrow macrophage precursors. I. Some functional characteristics of early cells of the mouse macrophage series. *Blood* 40:62.
28. Metcalf D. 1971. Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies in vitro. *J Cell Physiol*

77:277.

29. Van Furth R. 1978. Mononuclear phagocytes in inflammation. In: Handbook of Experimental Pharmacology. Inflammation and anti-inflammatory drugs. Vol 50/1. Vane JR, Ferreira SH (eds). Springer Verlag, Heidelberg. 68.
30. Nichols BA, Bainton DP, Farquhar MG. 1971. Differentiation of monocytes. Origin, nature and fate of their azurophil granules. *J Cell Biol* 50:498.
31. Van Furth R, Cohn ZA. 1968. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 128:415.
32. Cline MJ. 1970. Monocytes and macrophages: differentiation and function. In: Third Annual Red Cross Symposium on Formation and Destruction of Blood Cells. Greenwalt TJ, Jamieson GA (eds). JB Lippincott, Philadelphia. 222.
33. Cohn ZA. 1968. The structure and function of monocytes and macrophages. *Adv Immunol* 9:163.
34. Cohn ZA, Benson B. 1965. The differentiation of mononuclear phagocytes. Morphology, cytochemistry and biochemistry. *J Exp Med* 121:153.
35. Nathan CF, Murray HW, Cohn ZA. 1980. The macrophage as an effector cell. *N Engl J Med* 303:622.
36. Campbell PA. 1988. What T cells tell macrophages to do during resistance to listeriosis. In: Host Defense Immunomodulation to Intracellular pathogens. Eisenstein TK, Bullock WE, Hanna N (eds). Plenum Press, New York. 13.
37. Pink MA. 1976. The macrophage in neoplasia. Academic Press, New York.
38. Adams DO, Hamilton TA. 1984. The cell biology of macrophage activation. *Ann Review of Immunol* 2:283.
39. Cline MJ. 1975. Morphology and morphogenesis of the granulocytic series. In: *The White Cell*. Harvard University Press. 7-73.
40. Bainton DP, Ulliyot JL, Farquhar MG. 1971. The development of neutrophilic polymorphonuclear leucocytes in human bone marrow. Origin and content of azurophil and specific granules. *J Exp Med* 134:907.
41. Wetzel BK, Horn RG, Spicer SS. 1967. Fine structural studies on the development of heterophil, eosinophil, and basophil granulocytes in rabbits. *Lab Invest* 16:149.
42. Marmont AM, Damasio E. 1988. Neutrophils. In: Atlas of blood cells. Function and pathology. Zucker-Franklin D, Greaves MF, Grossi CE, Marmont AM (eds). Edi Ermes, Milano. 164.
43. Cline MJ. 1975. Chemotaxis, phagocytosis and microbial killing. In: *The White Cell*. Harvard University Press. 73
44. Nathan CF. 1987. Secretory Products of Macrophages. *J Clin Invest* 79:319.
45. Le J, Vilcek J. 1987. Biology of Disease. Tumor Necrosis Factor and Interleukin 1: Cytokines with multiple overlapping Biological Activities. *Lab Invest* 50:234.
46. Oppenheim JJ, Kovacs EJ, Matsushima K, Durum SK. 1986. There is more than one interleukin 1. *Immunol Today* 7:45.
47. Bennett IL, Beeson PB. 1953. The effect of injection

- of extracts and suspensions of uninfected rabbit tissues upon de body temperature of normal rabbits. *J Exp Med* 98:477.
48. Gery I, Waksman BH. 1972. Potentiation of the T lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediator(s). *J Exp Med* 136:143.
49. Murphy PA, Chesney J, Wood WB. 1974. Further purification of rabbit leucocyte pyrogen. *J Lab Clin Med* 83:310.
50. Dinarello CA, Goldin NP, Wolff SM. 1974. Demonstration and characterization of two distinct human leucocytic pyrogens. *J Exp Med* 139:1360.
51. Aarden LA, Brunner TK, Cerottini JC, Dayer JM, de Weck AL, Dinarello CA, Di Sabato G, Farr JJ, Gery I, Gillis S. 1979. Revised nomenclature for antigen-non-specific T cell proliferation and helper factors. *J Immunol* 123:2928.
52. Lomedico PT, Gubler U, Hellmann CP, Dukovich M, Giri JG, Pan YE, Collier K, Semionow R, Chua AO, Mizel SB. 1984. Cloning and expression of murine interleukin-1 in *Escherichia coli*. *Nature* 312
53. Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM, Dinarello CA. 1984. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin-1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:7907.
54. March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, Gillis CS, Henney SR, Kronheim K, Grabstein PJ, Conlon PJ, Hopp TP, Cosman D. 1985. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 315:641.
55. Furutani Y, Notake M, Fukui T, Ohue M, Nomura H, Yamada M, Nakamura S. 1986. Complete nucleotide sequence of the gene for human interleukin-1 $\alpha$ . *Nucleic Acids Res* 14:3167.
56. Clark BD, Collins KL, Gandy MS, Webb AC, Auron PE. 1985. Genomic sequence for prointerleukin-1  $\beta$ : possible evolution from a reverse transcribed prointerleukin-1 $\alpha$  gene. *Nucleic Acids Res* 14:7897.
57. Antoni G, Presentini R, Perini F, Tagliabue A, Ghiara P, Censini S, Volpini P, Villa L, Bortaschi D. 1987. A short synthetic peptide fragment from human interleukin-1 with immunostimulatory but not inflammatory activity. *J Immunol* 137:3201.
58. Dinarello CA. 1988. Biology of Interleukin 1. *FASEB J* 2:106.
59. Schindler R, Dinarello CA. 1990. Interleukin 1. In: Growth Factors, Differentiation Factors and Cytokines. Habenicht A (ed). Springer Verlag Berlin Heidelberg. 85-102.
60. Gordon AH, Parker ID. 1980. A pyrogen derived from human white cells which is active in mice. *Br J Exp Pathol* 61:534.
61. Cannon JG, Dinarello CA. 1985. Multiple interleukin-1 activities in luteal phase human plasma. *Br J Rheumatol* 24:226.
62. Kimball ES, Pikeral SP, Oppenheim JJ, Rossio JL. 1984. Interleukin-1 activity in normal human urine. *J Immunol* 133:256.

63. Bakouche O, Brown DC, Lachmann LB. 1987. Subcellular localization of human monocyte IL-1: evidence for an inactive precursor molecule and a possible mechanism for IL 1 release. *J Immunol* 138:42.
64. Lepe-Zuniga B, Gery I. 1984. Production of intracellular and extracellular interleukin-1 by human monocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 31:222.
65. Watsuskina K, Taguski M, Kovacs EJ, Young HA, Oppenheim JJ. 1987. Intracellular localization of human monocyte associated interleukin-1 activity and release of biologically active IL-1 from monocytes by trypsin and plasmin. *J Immunol* 136:2883.
66. Hazuda DJ, Lee JC, Young FR. 1986. The kinetics of interleukin-1 secretion from activated monocytes. *J Biol Chem* 263:6473.
67. Conlon PJ, Grabstein NH, Alpert A, Prickett KS, Hoop TP, Gillis S. 1987. Localization of human mononuclear cell interleukin-1. *J Immunol* 139:98.
68. Kilian PL, Kaffka KL, Stern AS, Woehle D, Benjamin WR, DeChiara TM, Gubler U, Farrar JJ, Mizel SB, Lomedico PT. 1986. Interleukin-1 $\alpha$  and  $\beta$  bind to the same receptor on T cells. *J Immunol* 136:4509.
69. Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, MacDonald HR, McMahan CJ, Grubin CE, Wignall JM, Jackson JL, Call SM, Friend D, Alpert AR, Gillis S, Urdal DL, Dower SK. 1988. cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 241:585.
70. Dinarello CA, Clark BD, Puren AJ, Savage N, Rosoff PM. 1989. The Interleukin 1 receptor. *Immunol Today* 10:49.
71. Bron C, Mac Donald MR. 1987. Identification of the plasma membrane receptor for Interleukin-1 on mouse Thymoma cells. *FEBS Lett* 219:365.
72. Spriggs MK, Lioubin PJ, Slack J, Dower SK, Uwe J, Cosman D, Sims JE, Bauer J. 1990. Induction of Interleukin-1 receptor (IL-1R) on monocytic cells. *J Biol Chem* 265:22499.
73. Dinarello CA. 1984. Interleukin 1. *Rev Infect Dis* 6:51.
74. Matsushima K, Procopio A, Abe H, Scala G, Ortaldo JR, Oppenheim JJ. 1985. Production of interleukin-1 activity by normal human peripheral blood B cells. *J Immunol* 135:1132.
75. Duff GW, Atkins E. 1982. The detection of endotoxin by in vitro production of endogenous pyrogen: comparison with limulus amoebocyte lysate gelation. *J Immunol Methods* 52:323.
76. Heremans JF. 1974. Immunoglobulin A. In: *The Antigens*, Vol 2. Sela M (Ed). Academic Press, New York. 4031.
77. Pernis B, Brouet JC, Seligmann M. 1974. IgD and IgM on the membrane of lymphoid cells in macroglobulinemia. Evidence for identity of membrane IgD and IgM antibody activity in a case with anti-IgG receptors. *Eur J Immunol* 4:776.
78. Ishizaka K. 1973. Chemistry and biology of immunoglobulin E. In: *The Antigens*, Vol 1, Sela M (ed). Academic Press. New York, USA. 479.
79. Hood LE, Weissman IL, Wood WB, Wilson JH. 1984.



- Immunology. 2nd ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. California, USA. 17-23.
80. Jeske DJ, Capra JD. 1984. Immunoglobulins: Structure and Function. In: Fundamental Immunology. Paul WE (ed). Raven Press. New York, USA. 131.
81. Putnam FW. 1977. The plasma proteins: Structure, Function and Genetic Control. Vol 3, 2nd ed. Academic Press. New York, USA.
82. Michaelson TE, Frangione B, Franklin EC. 1977. Primary structure of the "hinge" region of human IgG3. J Biol Chem 252:883.
83. Huber R, Deisenhofer J, Colman PM, Matsushima M, Palm W. 1976. Crystallographic structure studies of an IgG molecule and a Fc fragment. Nature 221:415.
84. Hilschmann N, Craig LC. 1965. Amino acid sequence studies with Bence Jones proteins. Proc Natl Acad Sci USA 53:1403.
85. Capra JD, Kehoe JM. 1975. Hypervariable regions idiotypy and the antibody combining site. Adv Immunol 20:1.
86. Porter RR. 1959. The hydrolysis of rabbit F-globulin and antibodies with crystallin papain. Biochem J 73:119.
87. Majima T, Itoh K, Yatsu J, Yoshie O, Ishida N. 1989. Sensitive detection of two IgG Fc receptors of mouse macrophages by chemiluminescence analysis. Immunopharm and Immunotoxicol 11:289.
88. Vetvicka V, Fornusek L, Kincade PW, Kopecek J. 1986. Co-expression of different types of Fc receptors on murine peritoneal macrophages. Eur J Immunol 16:901.
89. McKeever PE, Spicer SS. 1980. Surface receptors of mononuclear phagocytes. In: The reticuloendothelial system. A comprehensive treatise. Vol 1. Morphology. Carr I, Daems WT (eds). Plenum Press, New York.
90. Uher F, Dobronyi I, Gergel J. 1981. IgM-Fc receptor-mediated phagocytosis of rat macrophages. Immunol 42:419.
91. Fanger MW, Shen L, Push J, Bernier GM. 1980. Subpopulations of human peripheral granulocytes and monocytes express receptors for IgA. Proc Natl Acad Sci USA 77:3640.
92. Joseph M, Copron A, Butterworth AE, Sturrock RF, Houba V. 1978. Cytotoxicity of human and baboon mononuclear phagocytes against schistosomula in vitro: Induction by immune complexes containing IgE and Schistosoma mansoni antigens. Clin Exp Immunol 33:48.
93. Kinet JP. 1989. Antibody-cell interactions: Fc receptors. Cell 53:351.
94. Isturiz MA, Palermo M, Geffner J, Serebrinsky G, Giordano M. 1986. Significado biológico de los receptores celulares para IgG y su interacción con complejos inmunes. Adel Microbiol Enf Infecc 5:1.
95. Ryan US, Schultz DR, Ryan JW. 1981. Fc and C3b receptors on pulmonary endothelial cells: Induction by injury. Science 214:557.
96. Frade R, Kourilsky FM. 1977. Preliminary characterization of a glycoprotein having Fc receptor

- properties extracted from a T cell lymphoma. Eur J Immunol 7:663.
97. Anderson CL, Grey HM. 1977. Solubilization and partial characterization of cell membrane Fc receptors. J Immunol 118:819.
98. Tuijman WB, van de Winkel JGJ, Capel PA. 1990. A flow cytometric rosetting assay for the analysis of IgG-Fc receptor interactions. J Immunol Meths 127:207.
99. Anderson CL, Guyre PM, Whitin JC, Ryan DH, Looney RJ, Fanger MW. 1986. Monoclonal antibodies to Fc receptors for IgG on human mononuclear phagocytes antibody characterization and induction of superoxide production in a monocyte cell line. J Biol Chem 261:12856.
100. Shen L, Graziano RF, Fanger MW. 1989. The functional properties of FcRI, II and III on myeloid cells: A comparative study of killing of erythrocytes and tumor cells mediated through the different Fc receptors. Mol Immunol 26:959.
101. Fanger MW, Shan L, Graziano RF, Guyre PM. 1989. Cytotoxicity mediated by human Fc receptor for IgG. Immunol Today 10:92.
102. Dougherty GJ, Selvendran Y, Murdoch S, Palmer DG, Hogg N. 1987. The human mononuclear phagocyte high-affinity Fc-Receptor, FcRI, defined by a monoclonal antibody, 10.1. Eur J Immun 17:1453.
103. Jones DH, Looney RJ, Anderson CL. 1986. Two distinct classes of IgG Fc receptors on a human monocyte line (U937) defined by differences in binding of murine IgG subclasses at low ionic strength. J Immunol 135:3348.
104. Kurlander RJ, Roose WF, Logue GL. 1978. Quantitative influence of antibody and complement coating of red cells on monocyte-mediated cell lysis. J Clin Invest 61:1309.
105. Heusser CH, Anderson CL, Grey HM. 1977. Receptors for IgG: Subclass specificity of receptors on different mouse cell types and the definition of two distinct receptors on a macrophage cell line. J Exp Med 145:1316.
106. Anderson CL, Looney RJ. 1986. Human leucocyte IgG Fc receptors. Immunol Today 7:264.
107. Petroni KC, Shen L, Guyre PM. 1988. Modulation of human polymorphonuclear leukocyte IgG Fc receptors and Fc receptors-mediated functions by IFN $\gamma$  and glucocorticoids. J Immun 140:3467.
108. Liesveld JL, Abboud CN, Looney RJ, Ryan DH, Brennan JK. 1988. Expression of IgG Fc Receptors in myeloid leukemic cell lines. J Immunol 140:1527.
109. Anderson CL. 1982. Isolation of the receptor for IgG from a human monocyte cell line (U937) and from human peripheral blood monocytes. J Exp Med 156:1794.
110. Looney RJ, Abraham GN, Anderson CL. 1986. Human monocytes and U937 cells bear two distinct Fc receptors for IgG. J Immun 136:1641.
111. Rosenfeld SI, Looney RJ, Ledy JP, Phipps DC, Abraham GN, Anderson CL. 1985. Human platelet Fc receptor

for immunoglobulin G: Identification as a 4 000-molecular-weight membrane protein shared by monocytes. *J Clin Invest* 76:2317.

112. Tax WJM, Van de Winkel JGJ. 1990. Human Fc $\gamma$  receptor II: a standby receptor activated by proteolysis? *Immunol Today* 11:308.

113. Van de Winkel JGJ, Tax WJM, Van Bruggen MCJ, Van Roozendaal CEP, Willems HW, Vlug A, Capel PJA, Koene RAP. 1987. Characterization of two Fc receptors for mouse immunoglobulins on human monocytes and cell lines. *Scand J Immunol* 26:663.

114. Fleit HB, Wright SD, Unkeless JC. 1982. Human neutrophil Fc receptor distribution and structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:3275.

115. Perussia B, Trinchieri G. 1984. Antibody 3G8, specific for the human neutrophil Fc receptor, reacts with natural killer cells. *J Immunol* 132:1410.

116. Simmons D, Seed B. 1988. The Fc $\gamma$  receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein. *Nature* 333:568.

117. Clarkson SB, Ory PA. 1988. Developmentally regulated IgG Fc receptor on cultured human monocytes. *J Exp Med* 167:408.

118. Diamond B, Yelton DE. 1981. A new Fc receptor on mouse macrophages binding IgG3. *J Exp Med* 153:514.

119. Isturiz MA, Giordano M, Geffner JR, Palermo MS, Serebrinsky G. 1989. Interacción de los complejos inmunes  $\gamma$  sus receptores leucocitarios. *Medicina (Buenos Aires)* 49:140.

120. Griffin FM, Griffin JA, Leider JE, Silverstein SC. 1975. Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptor on the macrophage plasma membrane. *J Exp Med* 142:1263.

121. Lamers MC, DeGroot ER, Roos D. 1981. Phagocytosis and degradation of DNA-anti-DNA complexes by human phagocytes. I. Assay conditions, quantitative aspects and differences between human blood monocytes and neutrophils. *Eur J Immunol* 11:757.

122. Butterworth AC, Sturrock RF, Houba V, Mahmood AAP, Sher A, Rees PH. 1975. Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature* 256:727.

123. Miller GPG, Kohl S. 1983. Antibody-dependent killing of *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* 131:1455.

124. Schulz G, Bernol TF, Reisfeld RA. 1983. Monoclonal antibody directed effector cells selectively lyse human melanoma cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:5407.

125. Bianco C, Patrick R, Nussenzweig V. 1970. A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody complement complexes. I. Separation and characterization. *J Exp Med* 132:702.

126. Mendoza JF, López R, Weiss-Steider B. 1991. Inducción de

- receptores Fc y efecto proliferador de las interleucinas 1 y 2 recombinantes humanas (rhIL-1 y rhIL-2) sobre las líneas leucémicas WR19M.1 y WEHI3BD-. Sangre 36:205.
127. Meltzer MS, Crawford RM, Finbloom DS, Nacy CA. 1987. Lymphokine macrophage activation factors for induction of nonspecific, macrophage-mediated cytotoxicity against tumor cell and microbial targets. In: Biological Response Modifiers and Cancer Research. Chia JW (ed). Marcel Dekker Inc. New York.
128. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. 1983. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. J Exp Med 158:670.
129. Kleinerman ES, Zicht R, Sarin PS, Gallo RC, Fidler IJ. 1984. Constitutive production and release of a lymphokine with macrophage-activating factor activity distinct from gamma-interferon by a human T-cell leukemia virus-positive cell lines. Cancer Res 44:4470.
130. Nacy CA, Fortier AH, Meltzer MS, Buchmeir NA, Schreiber RD. 1986. Macrophage activation to kill *Leishmania major*: Activation of macrophages for intracellular destruction of amastigotes can be induced by both recombinant interferon-gamma and non-interferon lymphokines. J Immunol 135:3505.
131. Smith MF, Kneppers FR, Young FR, Lee JC. 1989. A rapid and quantitative method for the determination of interleukin-1 $\alpha$  and - $\beta$  mRNA expression in human monocytes and macrophages. J Immunol Meths 118:265.
132. Boraschi D, Villa L, Volpini G, Bossu P, Censini S, Ghiara P, Scapigliati G, Nencioni L, Bartalini M, Matteucci G, Cioli F, Carnasciali M, Olmastro E, Mengozzi M, Ghezzi P, Tagliabue A. 1990. Differential activity of interleukin 1 $\alpha$  and interleukin 1 $\beta$  in the stimulation of the immune response in vivo. Eur J Immunol 20:317.
133. Barroso E. 1988. El Registro Nacional del cáncer y sus aplicaciones. En: La Investigación del Cáncer en México. Urdiales J, Rangel R, Weiss-Steider B (eds). Universidad Nacional Autónoma de México.
134. Minami A, Fujimoto K, Ozaki Y, Nakamura S. 1988. Augmentation of host resistance to microbial infections by recombinant human interleukin-1. Infect Immun 56:3116.
135. Dexter TM. Haematopoietic Growth Factors. 1989. Brit Med Bull. 45:338.
136. Gabrilove JL. 1989. Introduction and overview of hematopoietic growth factors. Seminars in Hematol 26:2.
137. Van Furth R, Sluiter W. 1985. Macrophages as autoregulators of mononuclear phagocyte proliferation. In: Macrophage Biology. Sherwood R, Kojima M (eds). Alan R Liss, Inc., New York. 11.
138. Wasserman RL, Capra JD. 1977. Immunoglobulins. In: The Glycoconjugates. Horowitz M, Pigman W (eds). Academic Press, New York. 323.

**APENDICE I**

**MEDIO MINIMO ESENCIAL DE EAGLE**

Este medio se utilizó para realizar los cultivos celulares in vitro. El medio esta constituido de los siguientes componentes químicos:

AMINOACIDOS	CONCENTRACION (mg/ml)
L-arginina	84.00
L-cistina	62.57
L-glutamina	584.00
Glicina	30.00
L-histidina HCl, H <sub>2</sub> O	42.00
L-isoleucina	105.00
L-leucina	105.00
L-lisina, HCl	146.00
L-metionina	30.00
L-fenilalanina	66.00
L-serina	42.00
L-treonina	95.00
L-triptofano	16.00
L-tirosina (sal disódica)	104.20
L-valina	94.00

VITAMINAS	CONCENTRACION (mg/ml)
D-Ca pantotenato	4.00
Cloruro de colina	4.00
Acido fólico	7.20
Inositol	7.20
Nicotinamida	4.00
Piridoxal, HCl	4.00
Riboflavina	0.40
Tiamina	4.00

SALES INORGANICAS	CONCENTRACION (mg/ml)
Cloruro de calcio anhidro	200.00
Nitrato de hierro III nonhidratado	0.10
Cloruro de potasio	400.00
Sulfato de magnesio anhidro	97.67
Cloruro de sodio	6400.00
Fosfato monosódico monohidratado	125.00

OTROS COMPUESTOS	CONCENTRACION (mg/ml)
L-glucosa	4500.00
Rojo fenol	15.00

**Preparación del Medio:**

Se mide un volumen de agua bidestilada 5% menor al volumen de medio total deseado, para ello se utilizan dos matraces. Se adicionan 13.4 g/l del Medio de Eagle en polvo (Gibco Laboratorios, USA), se agita suavemente y se agregan 3.7 g de bicarbonato de sodio, 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomina. Se complementa el volumen deseado con agua bidestilada, se ajusta el pH entre 0.2 y 0.3 menos del que se desea (7.2) con ácido clorhídrico. Posteriormente se esteriliza por filtración con CO<sub>2</sub> y una membrana de poro de 0.22  $\mu$  (Millipore, USA).

## APENDICE II

### SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS

Esta solución se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables por periodos cortos de tiempo. La capacidad amortiguadora es dada por las sales de fosfato.

SALES	CONCENTRACION (g/l)
Cloruro de sodio	8.00
Cloruro de potasio	0.20
Fosfato monoácido de sodio	2.16
Fosfato diácido de potasio	0.20

Se diluyen las sales en 900 ml de agua bidestilada, se ajusta a un pH de 7.2 a 7.4 y se afora a un volumen de 1 l. La solución se esteriliza con membranas de 0.22  $\mu$  (Millipore, USA) y se almacena a 4°C hasta su uso.

## APENDICE III

### SOLUCION DE ALSEVER

Esta solución permite mantener a los eritrocitos de carnero en condiciones estables aproximadamente durante 30 días a una temperatura de 4°C. La siguiente fórmula es una modificación de la fórmula original de Alsever.

COMPUESTOS	CONCENTRACION (g/l)
Dextrosa	20.50
Citrato de sodio dihidratado	8.00
Acido cítrico monohidratado	0.55

En 900 ml de agua destilada se disuelven sucesivamente cada una de las sustancias, se ajusta aun pH de 6.1 y posteriormente se afora a 1 l. La solución se esteriliza en autoclave y se almacena a 4°C hasta su uso. Esta solución se utilizó para colocar los eritrocitos de carnero en una proporción 1:1 v/v.

### AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar mi agradecimiento a:

- La Biol. Elia Roldán, al M.C. Raúl Zavala y al M. en C. Jorge Flavio Mendoza por la revisión de este trabajo, sus comentarios y sugerencias para mejorarlo.
- La M. en C. Teresa Corona, por haberme adiestrado en las técnicas del laboratorio.
- A los señores Ranulfo Pedraza y José Chavarría, por su valiosa colaboración técnica.
- A Miguel Angel Ramírez, por su gran ayuda en la redacción de este trabajo.
- Al señor Angel Mejía, por su generoso apoyo.
- A la DGAPA, CONACyT y Secretaría de Investigación de la ENEP Zaragoza, por su ayuda durante la elaboración de esta tesis.
- Especialmente deseo agradecer al M. en C. Edelmiro Santiago y al Dr. Benny Weiss por su excelente asesoría en el desarrollo de este trabajo y por el gran apoyo que siempre me han brindado.