

124



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

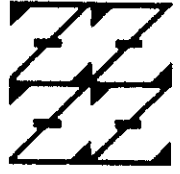
UNIDAD DE INVESTIGACION EN DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER LABORATORIO DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR DEL CANCER

EFFECTO DE LA INTERLEUCINA-1 BETA (IL-β) SOBRE LA EXPRESION DE RECEPTORES Fc PARA LA IgG, DIFERENCIACION MORFOLOGICA Y PROLIFERACION EN LA LINEA CELULAR MIELOIDE PRIMITIVA 32D C13 DE RATON.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: BIOL O G O PRESENTA: IGNACIO MARTINEZ MARTINEZ

UNAM FES ZARAGOZA



DIRECTOR DE TESIS: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

277950

MEXICO, D. F.

MARZO DEL 2000

LO HUBIERO EJS DE NUESTRA REFLEXION



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer.
Laboratorio de Diferenciación Celular y Molecular del Cáncer.

EFFECTO DE LA INTERLEUCINA-1 BETA (IL-1 β) SOBRE LA EXPRESION
DE RECEPTORES Fc PARA LA IgG, DIFERENCIACION MORFOLOGICA Y
PROLIFERACION EN LA LINEA CELULAR MIELOIDE PRIMITIVA 32D C13
DE RATÓN.

Tesis que para obtener el título de Biólogo presenta: Ignacio Martínez Martínez.

Director de tesis: Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo económico de DGAPA, a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), clave IN216397 y el Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación de la UNAM.

Dedicatorias

*A mis padres, Eva y Alfonso, por darme la oportunidad de llegar hasta aquí.
Su ejemplo constituye mi principal motivo de superación.*

*A mis hermanos, Juana y Armando, por estar siempre conmigo y compartirme
su alegría.*

*A Marta, por todo su amor, paciencia y apoyo incondicional.
Por hacer más agradable cada día de mi vida, gracias.*

A Nora, Sofía y Cristina, por brindarme su amistad.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Benny Weiss Steider y al Dr. Edelmiro Santiago Osorio, por permitirme participar en su grupo de trabajo y con ello enriquecer mi formación profesional.

A los miembros del jurado:

Dr. Benny Weiss Steider
Dr. Edelmiro Santiago Osorio
M. en C. Carlos Bautista Reyes
M. en C. Catalina Machuca Rodríguez
Dr. Isaac Rodrigo Zambrano Ramírez

Por sus valiosas observaciones para la mejor presentación de esta tesis.

A Gerardo por sus consejos y apoyo.

A Juan Montesinos por enseñarme las bases del cultivo celular.

A Don Ranulfo por su asistencia técnica.

Al resto de los miembros de la Unidad que, con su actitud, generan un agradable ambiente de trabajo.

INDICE

Resumen	I
Marco Teórico	1
Hematopoyesis	1
Células hematopoyéticas.	3
Línea celular 32D	4
Interleucina-1	6
Receptores FcγR	13
Planteamiento del problema	27
Hipótesis	28
Objetivos	28
Metodología.	29
Resultados	35
Discusión	46
Conclusiones	52
Bibliografía	53
Apéndice	68

RESUMEN

Los receptores para la fracción cristalizable de la inmunoglobulina G (Fc γ R), son moléculas de vital importancia en la defensa del organismo, ya que participan activamente en la eliminación de complejos inmunes. Se ha propuesto que un incremento en la expresión de receptores Fc γ R se correlaciona con un mayor grado de diferenciación morfológica, y una reducción en la capacidad de proliferación, tanto en células comprometidas, como en células precursoras.

Recientemente se demostró que la interleucina-1 beta (IL-1 β), tiene la propiedad de inducir la expresión de receptores Fc γ R en células sanguíneas maduras, así como de reducir la capacidad proliferativa de las células hematopoyéticas primitivas, sin embargo, en éste último caso se desconoce si tal inhibición se acompaña de expresión de receptores Fc γ R y diferenciación morfológica.

Por ello, en el presente trabajo se evaluó la capacidad de la interleucina-1 beta recombinante humana (rhIL-1 β), para inducir la expresión de receptores Fc γ R en células progenitoras mieloides, y si esta expresión se acompaña de cambios morfológicos y de una disminución en la capacidad proliferativa, utilizando para ello la línea mielóide primitiva 32D Cl3 de ratón, la cual es dependiente de IL-3.

Los resultados obtenidos señalan que la rhIL-1 β , induce la expresión de receptores Fc γ R de forma dosis-dependiente en estas células, teniendo un efecto notorio desde 5 hasta 100 ng/ml. De igual manera, tiene un efecto tiempo-dependiente en la expresión de estos receptores, mostrando su inducción desde las tres horas de estímulo con rhIL-1 β . Sin embargo, la expresión de receptores Fc γ R no favorece la inmunofagocitosis de complejos antígeno-anticuerpo, por las células 32D

La rhIL-1 β tampoco mostró capacidad para inducir la diferenciación morfológica, o actividad citoquímica específica para el linaje monocito-macrofago ni granulocito-neutrófilo.

Asimismo, la expresión de receptores Fc γ R a las 48 horas de estímulo con rhIL-1 β , se acompaña de una reducción en la proliferación de forma dosis-dependiente, observándose un efecto a partir de 1 ng/ml. Tal reducción en la capacidad proliferativa de las células 32D, no es debida a una disminución en la viabilidad, la cual se mantiene por arriba del 90%, ni a apoptosis que sea detectable por la reacción tunel.

Estos datos sugieren que la expresión de receptores Fc γ R, la reducción en la proliferación y la diferenciación morfológica, en las células 32D, son eventos que pueden seguir vías separadas y que tal vez no dependan forzosamente uno de otro.

MARCO TEORICO

Hematopoyesis

Las células sanguíneas tienen como función principal el transporte de oxígeno (a cargo de los eritrocitos), y la defensa en contra de organismos patógenos (a cargo de los leucocitos). Por su actividad biológica, muere un gran número de leucocitos, razón por la cual constantemente tienen que generarse nuevas células sanguíneas maduras, a partir de células precursoras. Esta renovación se lleva a cabo gracias al proceso conocido como hematopoyesis.

La hematopoyesis (del griego *haima*, sangre y *poyesis*, producción) es el proceso por el cual proliferan y se diferencian todas las células de la sangre, tanto mieloides como linfoides (Orkin, 1995), adquiriendo en este proceso nuevas características fenotípicas y funcionales (Allen & Dexter, 1990) (figura 1). Durante el desarrollo embrionario la hematopoyesis inicia en el saco vitelino, donde un grupo de células da origen a las precursoras totipotenciales o células madre hematopoyéticas, las cuales son transportadas posteriormente a diferentes órganos, siguiendo un esquema definido, llegando primero al timo e hígado (Toles *et al.*, 1989), posteriormente al bazo (Godin *et al.*, 1993) y por último a la médula ósea (Morrison *et al.*, 1995). Es en ésta última, particularmente en los huesos planos, donde se lleva a cabo la hematopoyesis en etapas adultas, ya que los otros órganos o centros hematopoyéticos dejan de ser funcionales (Hughes, 1991). Es además en este sitio donde el microambiente hematopoyético, constituido principalmente por células reticulares, endoteliales, fibroblastos, adipocitos y macrófagos, proporciona los factores de crecimiento necesarios para el óptimo desarrollo de las células hematopoyéticas (Allen & Dexter, 1990; Orkin, 1995; Whetton & Spooncer, 1998) (Figura 2). El sistema hematopoyético se compone de tres compartimentos: el primitivo, conformado por las células más primitivas o totipotenciales; el progenitor, conformado por células comprometidas a un linaje específico; el maduro, compuesto de todas las células maduras de la sangre como son los macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, trombocitos, megacariocitos, eritrocitos y linfocitos T y B (Klein, 1995; Ihle *et al.*, 1995)

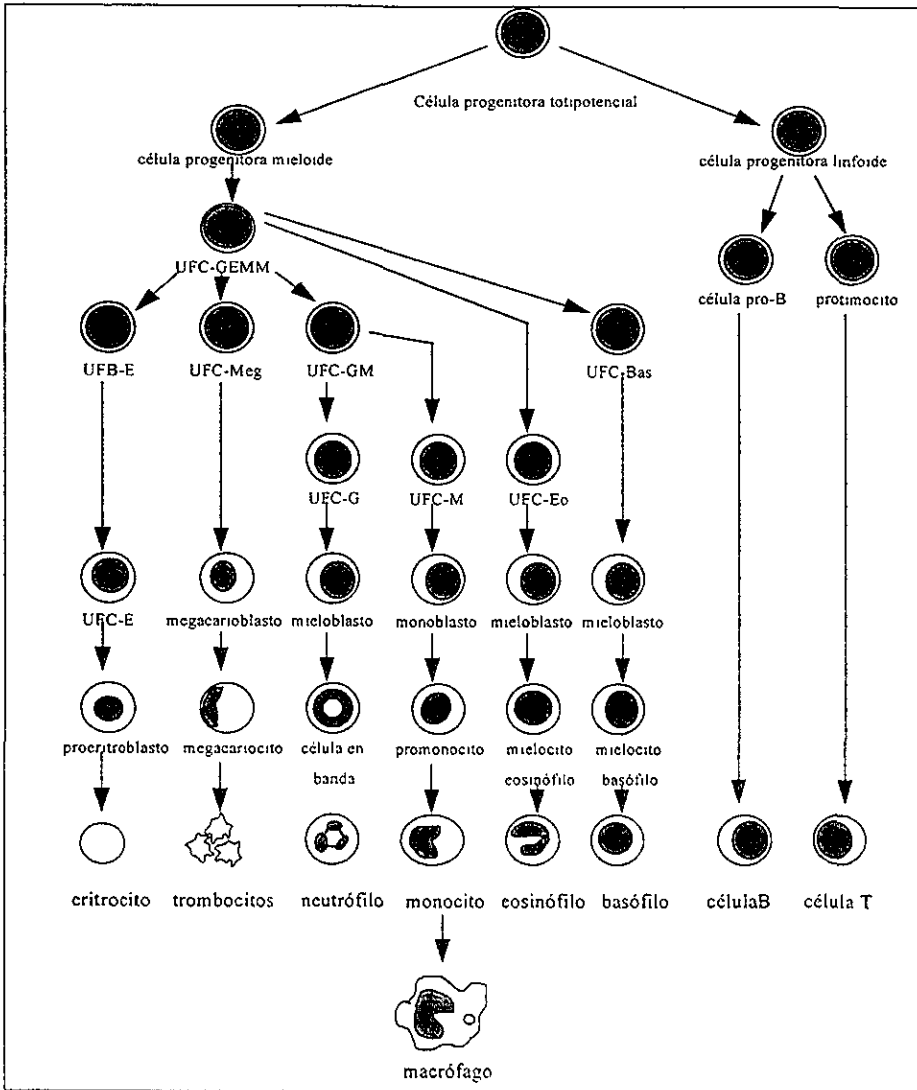


Figura 1. Esquema de la hematopoyesis, donde se muestran los diferentes estadios de diferenciación por los que atraviesan las células mieloides y linfoides, hasta convertirse en células maduras. UFC-GEMM, unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, monocitos y megacariocitos; UFB-E, unidad formadora de brotes eritroides; UFC-Meg, unidad formadora de colonias de megacariocitos; UFC-GM, unidad formadora de colonias de granulocitos y monocitos; UFC-Bas, unidad formadora de colonias de basófilos; UFC-G, unidad formadora de colonias de granulocitos; UFC-M, unidad formadora de colonias de macrófagos; UFC-Eo, unidad formadora de colonias de eosinófilos; UFC-E, unidad formadora de colonias de eritrocitos.

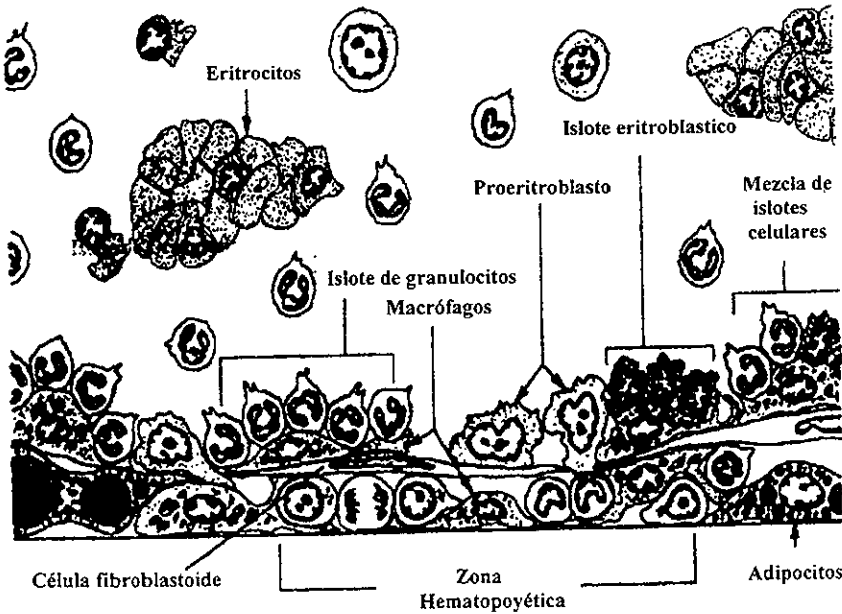


Figura 2. Esquema que muestra los tipos celulares constituyentes del estroma, y su interacción con las células hematopoyéticas. Tomado de Allen & Dexter, 1990.

Células hematopoyéticas

Las células responsables de sostener la hematopoyesis son conocidas como células progenitoras hematopoyéticas. Estas células se caracterizan por su alta capacidad proliferativa y de auto renovación (Ogawa & Matsunaga, 1999; Orlic & Bodine, 1994), así como por la ausencia de características morfológicas o citoquímicas, propias de las células maduras o comprometidas hacia algún linaje celular. Estas células son consideradas multipotenciales, dado que son susceptibles de comprometerse hacia cualquiera de los linajes celulares sanguíneos, cuando son estimuladas por la combinación de diferentes factores de crecimiento (Morrison *et al.*, 1995; Ogawa, 1993).

La existencia de células progenitoras hematopoyéticas, con capacidad para dar origen a todos los linajes, ha sido establecida a partir de observaciones que señalan que la inyección de células de médula ósea de ratones sanos, puede reconstituir la hematopoyesis normal de ratones irradiados letalmente (Gordon & Barret, 1985). Asimismo, la inyección de 5-Fluorourácilo (5FU) a ratones recuperados, induce la muerte de la mayor parte de las células hematopoyéticas, dejando vivas sólo algunas células quiescentes, con la capacidad de reconstituir la hematopoyesis normal a largo plazo, por lo que a estas células se les considera las más primitivas y han sido denominadas células madre hematopoyéticas (Orlic & Bodine, 1994).

El estudio sobre los procesos hematopoyéticos con células multipotenciales *in vitro*, se ha facilitado gracias a la obtención de clones de líneas hematopoyéticas multipotentes normales, cuyas células pueden cultivarse por tiempo indefinido, pero retienen la capacidad de diferenciarse a múltiples linajes celulares, y normalmente dependen de un factor de crecimiento para sobrevivir y proliferar. La ausencia de tumorigenicidad *in vivo* apoya fuertemente el argumento de que estas líneas no son malignas en el sentido clásico, por lo que constituyen una valiosa herramienta para el estudio de la diferenciación hematopoyética. Algunos ejemplos son las líneas celulares de ratón FDCEP-mix, B6SutA, B6JutA y 32D (Humphires *et al.*, 1981; Greenberger *et al.*, 1983; Yoshikawa *et al.*, 1996).

Línea celular 32D

La línea celular 32D es una línea dependiente de interleucina-3 (IL-3), que presenta la característica de ser diploide. Esta línea originalmente fue establecida de un cultivo de médula ósea a largo plazo de ratones C3/HeJ, inyectados con un virus de leucemia murina Friend. Estas células liberan al medio cantidades detectables de transcriptasa reversa, pero no liberan cantidades de virus que demuestren ser infectivos, además de que no inducen tumores cuando son inyectadas en ratones sanos compatibles para ello (Greenberger *et al.*, 1983). De los diferentes clones obtenidos de estas células, uno de los más empleados se ha denominado 32D C13

Estas células expresan receptores para diferentes factores de crecimiento, entre ellos IL-2 (Koyasu *et al.*, 1996), IL-4 (Lowenthal, 1988), eritropoyetina (Tsao *et al.*, 1988), G-CSF (Inoue *et al.*, 1998), incluso puede inducirse la expresión del receptor para GM-CSF (Kreider *et al.*, 1990) y en estas condiciones GM-CSF puede diferenciar a las células 32D (Bigas *et al.*, 1998).

En un principio se consideró que sólo IL-3 podía favorecer la supervivencia y formación de colonias de 32D (Metcalf, 1985). Sin embargo, estudios posteriores revelaron que algunas de estas células podían mantener cierta sobrevivencia y clonogenicidad, aún en ausencia de IL-3, siempre y cuando estuviera presente en el medio G-CSF (Valtieri *et al.*, 1987), asimismo, algunas de ellas respondían a GM-CSF y a eritropoyetina (Migliaccio *et al.*, 1989). Además de proliferar en respuesta a diferentes factores de crecimiento, estas células han conservado su capacidad para diferenciarse a distintos tipos celulares tales como basófilos y células cebadas (Migliaccio *et al.*, 1989), granulocito-neutrófilos (Valtieri *et al.*, 1987; Bigas, 1998) y monocito-macrófagos (Kreider *et al.*, 1990),

Por estas características, las células 32D han sido utilizadas para estudiar múltiples procesos del control de la hematopoyesis normal (Boosalis *et al.* 1997; Sanchez *et al.* 1998) y de la hematopoyesis leucémica (Britos-Bray *et al.* 1996; Di Renzo *et al.* 1993), así como de los procesos de diferenciación mieloide mediados por factores de crecimiento (Harris *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 1998; Hu & Chien, 1998; Xu *et al.*, 1998).

Factores de crecimiento hematopoyético

Los factores de crecimiento hematopoyético (FCH), son citocinas de naturaleza glicoproteica, las cuales son producidas principalmente por las células estromales del micro ambiente hematopoyético de la médula ósea (Allen & Dexter, 1990; Bendzen, 1994), e incluso pueden ser producidas por las propias células hematopoyéticas en respuesta a un estímulo. Tales factores modulan el crecimiento, proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas (Whetton & Spooncer, 1998). Actualmente se ha caracterizado una amplia variedad de citocinas que participan como factores de crecimiento en la regulación

hematopoyética, incluso antagonistas de algunas citocinas como el IL-1Ra (Aman *et al.*, 1994). Estas citocinas se han dividido por su efecto biológico y características moleculares en varias familias: factores de crecimiento, interleucinas e interferones (Tabla 1).

Las citocinas secretadas en la médula ósea, pueden permanecer en forma soluble o unidas a moléculas de la matriz extracelular. También se han encontrado citocinas adheridas a la membrana celular como es el caso de Steel Cell Factor (SCF), interleucina-1 (IL-1) y el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) (Lowry & Quesenberry, 1992). Todos estos factores participan en mayor o menor proporción en el desarrollo de la hematopoyesis, pero algunos de ellos parecen tener un papel más relevante que otros, tal es el caso del Multi-CSF o Interleucina-3 (IL-3), que induce la proliferación de varios linajes celulares, incluyendo eosinófilos, eritrocitos, basófilos, megacariocitos, granulocitos-neutrófilos, y monocito-macrófagos (Metcalf, 1993), al igual que puede inhibir la proliferación de otros tipos celulares, tales como células formadoras de colonias (Yonemura *et al.*, 1996).

Otra citocina muy importante en el proceso hematopoyético es la Interleucina-1 (IL-1), ya que influye sobre la proliferación de células hematopoyéticas, a través de la inducción de la producción de factores de crecimiento hematopoyético por las células estromales de médula ósea (Dinarelli, 1994; Fibbe & Falkenburg, 1990), y en la inducción de los receptores para estas citocinas en las células progenitoras (Orikasa *et al.*, 1993).

Interleucina-1

La interleucina-1 es una molécula de naturaleza glicoproteica, que se encuentra en dos formas biológicas activas, la IL-1 α y la IL-1 β . Ambas interleucinas se unen al mismo receptor, a pesar de no compartir mucha homología en la secuencia de aminoácidos (22%).

Tabla 1. Citocinas que intervienen en la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas.

Familias	Moléculas	Sinónimos	Peso mol. (kD)	Fuente celular	Principales células blanco
Factores De Crecimiento	Multi-CSF GM-CSF G-CSF M-CSF EPO SCF	IL-3 CSF-a CSF-b CSF-1 Ligando c-kit	14-28 14-35 18-22 35X2 34-39 51X2	LT,CET,CC LT,M,F,CE M,F,CE M,F,CE CPR,CK CEMO	Progenitoras multipotenciales Macrófagos y neutrófilos Neutrófilos Macrófagos Eritrocitos Progenitores mieloides y linfo.
Interleucinas	IL-1 IL-2 IL-4 IL-5 IL-6 IL-7 IL-8 IL-9 IL-10 IL-11 IL-12 IL-13 IL-14	Hematopoyetina-1 TCGF BSF-1 BCGF-CSF BSF-2 NCF/NAP P40	17.5 15-20 15-20 21.5X2 21-28 25 8-10X2 32-39 19X2 20-23 35-40 12 45	M,N,CE, F, LT LT LT, M, B, CC LT, CC, Eo LT,M,F,CE,H CEMO M,N,F,LT,CE LT LT,M CEMO M,LB LT LT	Linfocitos, Células estromales Progenitores hematopoyéticos Linfocitos T y Células NK Linfocitos T y B Eosinófilos Megacariocitos, Linfocitos Precursores T y B Monocitos y Neutrófilos Linfocitos y eritrocitos Macrófagos Progenitores hematopoyéticos Progenitores hematopoyéticos Linfocitos B Linfocitos B
Interferones	IFN- α IFN- β IFN- γ	IFN de leucocitos IFN de fibroblastos IFN inmune	16-27 20 17X2	LB,NK,M F,CE,M LT,NK	Células tumorales e infectadas Macrófagos y Neutrófilos
Factores de Necrosis Tumoral	TNF- α TNF- β	Cachectina Linfotixina	17X1-5 20-180 X3	M,LT,LB,NK LT LB	Células epiteliales
Factores de Crecimiento Transformante	TGF- α TGF- β		26 12.5X2	M,Q F,M,LT	Fibroblastos Endotelio y epitelio
Factores Inhibidores de leucemia	LIF		46	CEMO,F,LT,M	Progenitores hematopoyéticos

LT= Linfocitos T, CET= Células epiteliales del tumor, CC= Células cebadas; F= Fibroblastos, M= Macrófagos, N= Neutrófilos; CE= Células endoteliales; CPR= Células peritubulares del riñón; CK= Células de Kupfer (hígado); CEMO= Células estromales de médula ósea; B= Basófilos; Eo= Eosinófilos; H= Hepatocitos, LB= Linfocitos B; NK= Células Natural Killer; Q= Queratinocitos.

Existe otra molécula similar a la IL-1 β que se une al mismo receptor, pero a diferencia de las dos primeras, no despierta ninguna actividad biológica, por estas características se le ha dado el nombre de antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1Ra)

Las tres moléculas constituyen la familia de la IL-1. Los genes que codifican para cada uno de los miembros de esta familia, se localizan en el brazo largo del cromosoma 2, sitio en el que también se localizan los genes para los dos tipos de receptores que fijan a la IL-1 (Webb *et al.*, 1986).

La IL-1 α y la IL-1 β son moléculas secretadas de 17 kDa, las cuales provienen de un precursor denominado pro-IL1 α y pro-IL1 β , cada uno de los cuales pesa 31 kDa, y son cortados por enzimas proteolíticas para generar las formas maduras. Cabe señalar que la forma inmadura y madura de la IL-1 α tienen actividad biológica, en cambio la IL-1 β sólo presenta actividad en su forma madura (Dinarello, 1994).

La IL-1 α es la forma principal adherida a la membrana, mientras que la IL-1 β es preferentemente una proteína de secreción. Además, ambas formas pueden encontrarse en el sobrenadante de los cultivos y fluidos corporales; sin embargo, la forma más abundante es la IL-1 β . El antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1Ra) también es secretado, aunque se han encontrado formas que son retenidas en el interior de las células, probablemente por carecer del péptido señal, y ambas son funcionalmente indistinguibles (Dinarello, 1994). La homología de la IL-1 β entre varias especies está en un rango de 75 a 78 %, y de la IL-1 α es del 60 a 70 % (Dinarello 1989), lo que puede explicar la ausencia de restricción especie específica.

Los principales productores de IL-1 son los macrófagos (hasta 100 ng/ millón de monocitos) (Lisi *et al.*, 1987), tanto en humano como en ratón (Kovacs *et al.*, 1987) (figura 3), aunque se sabe que el estado de diferenciación juega un papel muy importante en la secreción de IL-1 por estas células (Pirhonen *et al.* 1999), y también que la presencia de material viral les confiere una elevada capacidad para la producción espontánea de IL-1 (Basta *et al.*, 1999) (tabla 2).

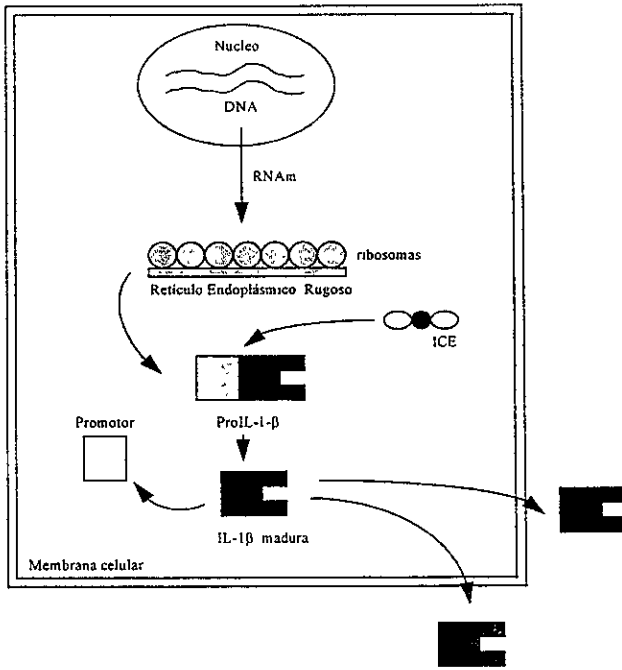


Figura 3. Producción de IL-1 β por monocitos. La enzima convertidora ICE es la encargada de promover la forma madura de IL-1 β , a partir de una forma inmadura denominada proIL-1 β . Tomado y modificado de Dinarello, 1996.

Esta citocina también es sintetizada por los neutrófilos, linfocitos T y B, queratinocitos, células de cerebro de rata, microglías, células endoteliales, fibroblastos, células epiteliales y células de riñón (Dinarello, 1994). También en células hematopoyéticas progenitoras humanas de cordón umbilical, se ha detectado la presencia de elevados niveles de mRNA para IL-1, así como para su enzima convertidora (ICE). Asimismo se ha detectado por inmunoprecipitación la presencia de IL-1 en el sobrenadante de estas células en cultivo (Watari *et al.*, 1996).

Tabla 2. Principales inductores de IL-1 β y de IL-1Ra.

Inductor	IL-1 β	IL-1Ra
Virus	+	+
Bacterias	+	+
Productos microbiales solubles	+	+
IL-1	+	+
TNF	+	+
IL-4/IL-13	-	+
IL-10	-	+
PDGF	-	+
IFN α y γ	-	+
IL-6	-	+
TGF β	-	+
G-CSF	+/-	+
GM-CSF	+/-	+
Cristales de calcio	+	+/-
Mycobacterium bovis	+	+/-
Enterotoxina A de Staphilococcus	+	+/-
Borrelia Burgdorferi	+	+/-

TNF, factor de necrosis tumoral; IL-4, interleucina-4; IL-10, interleucina-10; IL-13, interleucina-13; PDGF, factor derivado de plaquetas; IFN α y γ , interferón alfa ó gamma; IL-6, interleucina-6; TGF β , Factor de crecimiento transformante beta; G-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos; GM-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos. El signo + indica que se produce; el signo - indica que no se produce; el signo +/- indica que se produce escasamente. (Tomado y modificado de Dinarello, 1996).

Existe una amplia gama de los efectos biológicos mediados por la IL-1 (tabla 3), entre ellos está su propiedad de inducir la expresión de genes tales como los de prostaglandinas y leucotrienos, IL-8, e incluso de su propio gen (Dinarello *et al.*, 1987) y de protooncogenes como c-fos y c-jun (Mucgge *et al.*, 1993). También favorece la estabilización de mRNA como el de GM-CSF (Griffin *et al.*, 1990) y regula negativamente la expresión de genes como el de la albúmina y del citocromo p450 (Ghezzi *et al.*, 1986). La IL-1 inhibe las contracciones del músculo liso de la pared vascular (Beasley *et al.*, 1989), inhibe la contracción cardiaca a través de la producción de óxido nítrico (Finkel *et al.*, 1992), actúa como un fuerte pirógeno en sistema nervioso central (Tewari *et al.*, 1990), induce un incremento (2 a 3 veces) de la síntesis de proteínas hepáticas normales, promueve la proteólisis (Moldawer *et al.*, 1988), inhibe la síntesis de glicosaminoglicanos y colágena, componentes de la matriz extracelular y de los cartilagos.

Tabla 3. Efectos biológicos de la IL-1.

Efecto biológico	Tipo celular en el que se presenta
Producción de óxido nítrico	Células musculares cardíacas
Incremento en la síntesis de proteínas	Células hepáticas
Actividad pirogénica	Células de sistema nervioso central
Actividad quimiotáctica	Granulocitos
Inducción a la proliferación	Células progenitoras hematopoyéticas, osteoblastos, queratinocitos, fibroblastos, células mesenquimales, células de músculo liso, células gliales, algunas células tumorales y células T.
Inhibición de la proliferación	Células hematopoyéticas, endometrio, endotelio, células cancerosas de mama y tiroideas.
Producción de factores de crecimiento	Células de estroma de médula ósea.
Inducción de apoptosis	Fibroblastos, neuronas, células β productoras de insulina y células mononucleares de pacientes con lepra.
Inhibición de apoptosis	Neutrófilos
Inducción a la diferenciación	Células endoteliales
Inducción de receptores para factores de crecimiento	Células hematopoyéticas, células dendríticas y fibroblastos.
Inducción de receptores Fc γ R	Células mieloides maduras
Incremento de la actividad fagocítica	Células mieloides maduras

Tomada y modificada de Dinarello, 1996.

La IL-1 también induce la producción de metaloproteasas y gelatinasas, las cuales contribuyen a la destrucción del cartilago (Krane *et al.*, 1990), y actúa como un agente quimiotáctico para granulocitos (Colotta *et al.*, 1993).

La IL-1 puede favorecer o inhibir la proliferación, dependiendo del tipo celular sobre el cual actúe. De esta forma promueve la proliferación de osteoblastos, keratinocitos, fibroblastos, células de músculo liso, células gliales, algunas células tumorales y células T (Curtisnger *et al.*, 1999; Estrov & Talpaz, 1997; Kohase *et al.*, 1987; Libby *et al.*, 1988). Inhibe la proliferación de células de endometrio, células de endotelio, células cancerosas de mama y de tiroideas (Cozzolino *et al.*, 1990; Gaffney *et al.*, 1988; Lin *et al.*, 1998. Van Le *et al.*, 1992).

Respecto a la hematopoyesis, los datos generados son contradictorios, ya que por un lado se ha reportado que la IL-1 participa en la proliferación de células hematopoyéticas, induciendo la producción de citocinas y factores de crecimiento por las células estromales de médula ósea (Dinarello, 1994). Además favorece la supervivencia y proliferación de las células precursoras hematopoyéticas, con lo cual facilita la recuperación de ratones irradiados letalmente (Dinarello, 1994; Fibbe & Falkenburg, 1990; Jovicic *et al.*, 1996; Kennedy & Borch, 1999; Snoeck *et al.*, 1994). Sin embargo, otros trabajos señalan que la IL-1 puede participar como un regulador negativo de la proliferación de células hematopoyéticas (Kindler *et al.*, 1991; Lovett *et al.*, 1986; Onozaki *et al.*, 1987). Incluso se ha propuesto que disminuye la capacidad de las células progenitoras para reconstituir a ratones irradiados letalmente (Yonemura *et al.*, 1996), y que no es indispensable para la proliferación de los progenitores hematopoyéticos (Jazwiec *et al.*, 1998). Algunos datos sugieren que el doble papel de la IL-1 sobre la proliferación celular, puede estar ampliamente relacionado con la concentración de citocina presente, ya que se ha observado que la inyección de 1 $\mu\text{g/ml}$ de IL-1, en animales y humanos, incrementa el número de granulocitos circulantes (Ulich *et al.*, 1987), pero con dosis más altas se desencadena una granulocitopenia (Shieh *et al.*, 1990).

Por otra parte, la IL-1 tiene la capacidad de inducir la apoptosis en fibroblastos (Miura *et al.*, 1993), neuronas (Gagliardini *et al.*, 1994), células β productoras de insulina (Larsen *et al.*, 1998) y células mononucleares de pacientes con lepra (Gupta *et al.*, 1999), pero en las células precursoras hematopoyéticas no se ha reportado esta propiedad. Por el contrario, se sabe que en células granulocíticas, participa activamente en la inhibición de la apoptosis (William *et al.*, 1998).

La participación de la IL-1 en los procesos de diferenciación celular ha sido poco estudiada. Se sabe que esta citocina promueve el fenotipo maduro de células endoteliales (Maier *et al.*, 1990), pero aparentemente por si misma no tiene un efecto diferenciador sobre las células hematopoyéticas, para ello requiere la presencia de factores de crecimiento hematopoyético (Crown *et al.*, 1995; Dinarello 1994).

Recientemente se ha propuesto que la IL-1 tiene la capacidad de incrementar la fagocitosis de bacterias por células monocíticas y células U-937 (Davidson *et al.*, 1998), esta propiedad probablemente se deba a la capacidad que esta citocina ha mostrado para inducir la expresión de receptores FcγR en células mieloides, tanto normales como leucémicas (Flores, 1997; Onozaki *et al.*, 1988; Santiago *et al.*, 1993).

Receptores FcγR

Una de las funciones más importantes de los leucocitos sanguíneos y de los macrófagos de los tejidos, es proteger al organismo de agentes extraños a través del reconocimiento y eliminación de los complejos antígeno-anticuerpo. La eliminación de complejos inmunes es mediada a través de la fijación de la fracción cristalizante (Fc) de las inmunoglobulinas a sus receptores (Clynes *et al.*, 1998; Toyabe *et al.*, 1997) (figura 4).

Existen diferentes tipos de receptores que tienen la capacidad de interactuar con la fracción Fc de las inmunoglobulinas; entre ellos se encuentran los transportadores de inmunoglobulinas como el receptor para IgA e IgM (Uher *et al.*, 1981; Toyabe *et al.*, 1997), así como receptores que unen IgE (Conrad, 1990). Sin embargo el grupo más grande es el de los receptores específicos para la fracción Fc de las inmunoglobulinas G (IgG), también llamados receptores Fc gamma (FcγR), los cuales permiten el reconocimiento y destrucción de células o partículas cubiertas con IgG (Indik *et al.*, 1995; Voice & Lachmann, 1997) (figura 5).

Los FcγRs son glicoproteínas de superficie celular, que comprenden una familia conformada por múltiples miembros con cierta homología estructural. Dichos receptores son portados por una amplia diversidad de células (Ravetch & Kinet, 1991; Shido *et al.*, 1995). Las funciones de estos receptores no se limitan sólo a la inmunofagocitosis, como se ha propuesto tradicionalmente (Flesch *et al.*, 1998; Moura *et al.*, 1997), sino que pueden tener diferentes funciones dependiendo del tipo celular en el que se expresen (Ross & Newman, 1984)

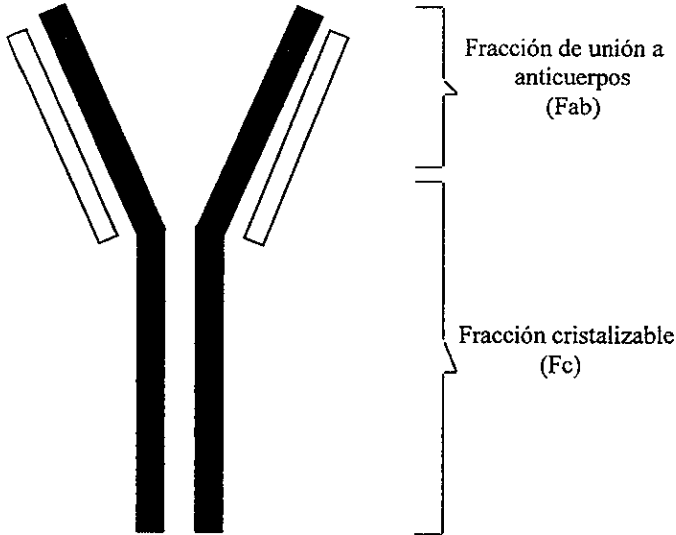


Figura 4. Molécula de inmunoglobulina, donde pueden distinguirse las cadenas pesadas (barras oscuras) y las cadenas ligeras (barras claras). La fracción Fab se encarga del reconocimiento de los agentes patógenos, mientras que la fracción cristalizante se acopla a los receptores Fc para iniciar la respuesta en las células del sistema inmune.

Diversos estudios de los genes y proteínas codificadas por esta familia de receptores, han demostrado que los diferentes tipos de FcγR tienen altamente conservado los dominios extracelulares tipo inmunoglobulina, pero difieren ampliamente en sus dominios transmembranales e intracelulares. La divergencia de estas regiones sugiere que aunque muchas de ellas son responsables de la transducción de señales (Ravetch & Kinet, 1991), tal vez no todas están involucradas en esta actividad (Indik *et al.*, 1995).

Por análisis molecular se ha identificado, en humano y en ratón, la presencia de diferentes genes que codifican para los receptores FcγR. Los productos de esos genes se han dividido en tres grupos principales: FcγRI, FcγRII y FcγRIII (Ravetch, 1994; Indik *et al.*, 1995). Dicha clasificación tiene su fundamento en las características bioquímicas de cada uno de ellos, tales como su afinidad y especificidad por los diferentes isotipos de IgG, distribución celular, peso molecular y reconocimiento por anticuerpos monoclonales (Hullet & Hogarth, 1994)

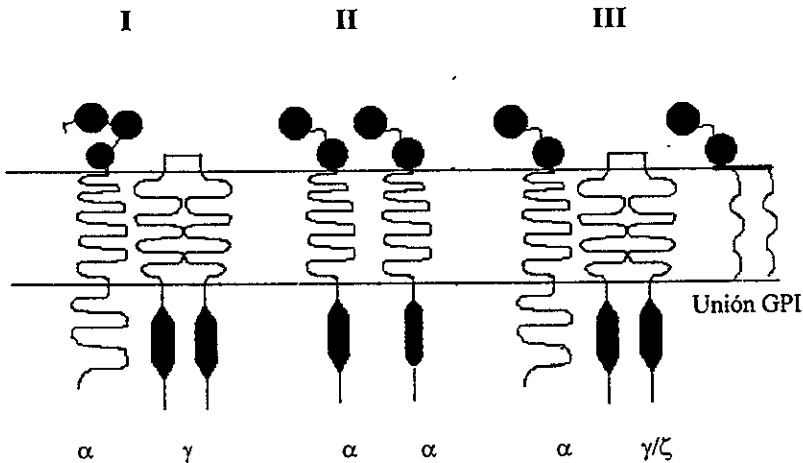
Receptores Fc γ R

Figura 5. Miembros que integran la familia de los Fc γ R. Las cadenas α constituyen las proteínas tradicionalmente conocidas como receptores Fc γ R y son las únicas que tienen dominios extracelulares (esferas), un transmembranal y un citoplásmico. Las cadenas γ y ζ permiten el anclamiento a la membrana, además de portar los segmentos de activación por receptores antigénicos (ARAM's) (cilindros), indispensables en la transducción de señales. Tomada de Ravetch, 1994.

mFc γ RI

El Fc γ RI de ratón (mFc γ RI) (antígeno CD64) es una glicoproteína de 70,000 daltones (Quilliam *et al.*, 1993), la cual tiene una región extracelular de tres dominios a diferencia del mFc γ RII y mFc γ RIII que sólo tienen dos. El tercer dominio de este receptor es distinto a los dos primeros, los cuales son homólogos entre los tres tipos de Fc γ R. Gracias al tercer dominio, el mFc γ RI fija IgG monomérica con alta afinidad (Hullet *et al.*, 1991). Este receptor tiene 273 aminoácidos en la región extracelular, 23 en la transmembranal y 84 en la citoplásmica, posee una homología con el receptor humano de 75 % en las regiones extracelular y transmembranal, aunque a nivel de la región citoplásmica se presenta una mayor variabilidad (homología del 25 %), además de que el receptor de ratón tiene 23 aminoácidos adicionales (Sears *et al.*, 1990).

El mFcγRI tiene una alta afinidad ($K_a = 10^7$ - 10^8 M⁻¹), y aunque es específico para la IgG2a monomérica de ratón, también puede unir isotipos de IgG humana, en la misma forma que el receptor humano (Hulett *et al.*, 1991).

La célula que expresa comunmente el mFcγRI, al igual que su homólogo humano, es el monocito-macrófago (Unkeless *et al.*, 1979), aunque este receptor puede ser inducido en neutrófilos, por acción del factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y el interferón gamma (IFNγ) (Reep *et al.*, 1991; Kerst *et al.*, 1993). El mFcγRI se ha considerado un marcador del linaje granulo-monocítico de las células progenitoras hematopoyéticas CD34+, ya que este comienza a expresarse cuando estas células dejan de ser multipotenciales y se comprometen (Olweus *et al.*, 1995). Algunos estudios le confieren a esta molécula un papel potencial en la destrucción de células tumorales dependiente de anticuerpos (Graziano & Fanger, 1987), también se le ha conferido cierta relación con las cinasas Hck y Lyn, para poder desempeñar su papel en la transducción de señales (Wang, *et al.*, 1994). Sólo se ha descrito un gene para mFcγRI que, a diferencia de todos los demás FcγRs, se localiza en el cromosoma 3 (Osman *et al.*, 1992).

Se ha observado que el mFcγRI puede asociarse con homodímeros de la cadena γ del receptor de alta afinidad para la IgE (FcεR). Aunque la asociación con estos dímeros no es indispensable para la expresión del receptor, se ha propuesto que la asociación es necesaria para que se lleve a cabo la transducción de señales (Ernst *et al.*, 1993). Recientemente se ha atribuido a la cadena γ el aumento de la afinidad del mFcγRI por sus ligandos (Miller *et al.*, 1996).

Aún no se han reportado anticuerpos específicos que reconozcan al FcγRI de ratón (Hulett & Hogarth, 1994).

mFcγRII

El mFcγRII tiene un peso molecular muy heterogéneo, que va desde 40 a 60 kD (Hibbs *et al.*, 1985; Looney *et al.*, 1986). Para este receptor se han encontrado dos transcritos, que codifican para proteínas transmembranales conocidas como mFcγRIIb1 y mFcγRIIb2. Ambos codifican para receptores idénticos, excepto por una delección de 47 aminoácidos del dominio citoplásmico para el mFcγRIIb2. De esta manera, los dos receptores tienen una región extracelular con dos dominios tipo inmunoglobulina, de 180 aminoácidos cada uno, un dominio transmembranal, de 26 aminoácidos, y un citoplásmico, de 94 (mFcγRIIb1) o de 47 (mFcγRIIb2) aminoácidos (Hogarth *et al.*, 1991).

Recientemente se ha aislado un tercer cDNA designado mFcγRIIb3, que codifica para una proteína similar a mFcγRIIb2, pero que carece de la región transmembranal. por lo cual es una forma soluble. Los receptores mFcγRIIb1, mFcγRIIb2 y mFcγRIIb3 muestran una homología del 60 % con respecto a los receptores humanos (Tartour *et al.*, 1993).

Para este receptor también se han descrito dos formas alélicas conocidas como Ly-17^a y Ly-17^b, que codifican para los antígenos Ly-17.1 y Ly-17.2, respectivamente. Este polimorfismo se basa en dos aminoácidos diferentes en el segundo dominio extracelular del mFcγRII, con prolina y glutamina o leucina y leucina en las posiciones 116 y 161 de las formas a y b respectivamente. La importancia biológica de estas formas polimórficas se desconoce (Lah *et al.*, 1990).

Los mFcγRII también unen IgG monomérica humana, con la misma especificidad que el receptor humano, y también con muy baja afinidad ($10^7 M^{-1}$). Además, interactúa con la IgG preferentemente cuando ésta se encuentra formando complejos (Van Den *et al.*, 1994). Los isotipos de IgG de ratón que unen este receptor son IgG1, IgG2a e IgG2b (Unkeless *et al.*, 1989).

El FcγRII de ratón se expresa en monocito-macrófagos, eosinófilos, plaquetas, megacariocitos, células T y B, células trofoblásticas y neutrófilos (Shido *et al.*, 1995; Unkeless, 1989).

Respecto a la expresión de las diferentes isoformas, se ha demostrado que ésta es selectiva. La isoforma mFcγRIIb1 se expresa principalmente en linfocitos B, mientras que la isoforma mFcγRIIb2 se expresa principalmente en monocitos y macrófagos (Unkeless *et al.*, 1988).

En el ratón sólo se ha descrito un gene para el mFcγRII, el cual se encuentra en el cromosoma 1, unido al mFcγRIII (Unkeless *et al.*, 1988).

Los mFcγRII son reconocidos por el anticuerpo monoclonal de rata 2.4G2, que bloquea al sitio de unión de la IgG, y que también puede reconocer al mFcγRIII. Existe otro anticuerpo de ratón conocido como anti-Ly-17.2 que detecta la forma polimórfica Ly-17.2 y también bloquea al sitio de unión (Hibbs *et al.*, 1985)

m FcR III

El FcγRIII de ratón (mFcγRIII), también conocido como CD16, tiene un peso molecular muy heterogéneo, dado que en células de ratón se han reportado formas de 40 a 80 kD. Esta heterogeneidad se debe a diferentes grados de glicosilación de estas moléculas (Lanier *et al.*, 1988; Mellman *et al.*, 1988). Este receptor está organizado en una región extracelular de 184 aminoácidos (dividida en dos dominios tipo inmunoglobulina), una región transmembranal de 21 aminoácidos y una región citoplásmica de 26 aminoácidos.

El mFcγRIII tiene una baja afinidad por la IgG monomérica ($K_a < 10^{-6} M^{-1}$), y especificidad por la IgG2a y la IgG2b de ratón, y por la IgG1 e IgG3 de humano, por lo que es considerado un receptor de baja afinidad (Kipps *et al.*, 1985).

Este receptor es expresado principalmente en neutrófilos, y en menor proporción en macrófagos (Wallace *et al.*, 1994), células NK (Perussia & Ravetch, 1991) y células T (Braakman *et al.*, 1993), así como en timocitos fetales tempranos. La modulación positiva para el FcR_{III} de ratón parece ser responsabilidad del IFN γ (Weinshank *et al.*, 1988). A diferencia de los dos genes reportados para el Fc γ R_{III} humano, en el ratón sólo se ha descrito un gene, que codifica para una glicoproteína transmembranal designada mFc γ R_{III}, que muestra una gran similitud con la forma transmembranal humana. De acuerdo con la homología de sus secuencias de aminoácidos, a su organización genómica y a su distribución celular y funciones, el Fc γ R_{III} de ratón y de humano son considerados moléculas homólogas.

Para el mFc γ R_{III} solo existe un anticuerpo llamado 2.4G2 que reconoce a esta molécula y también puede reconocer al mFc γ R_{II} (Hulett & Hogarth, 1994).

Funciones biológicas de los Fc γ R

La distribución selectiva de los receptores Fc γ R y su diversidad les permite mediar una amplia variedad de respuestas. La capacidad de estos receptores para unir diferentes ligandos representa una característica interesante, ya que la respuesta de una célula en particular al entrecruzamiento de sus receptores Fc γ R por complejos inmunes, está determinada no por la especificidad del ligando, sino por los dominios transmembranales y citoplásmicos de los Fc γ R que se expresan en dicha célula. De esta manera los dominios de unión del ligando son comunes a todos los Fc γ R, y éstos se encuentran acoplados a diferentes dominios intracelulares transductores de señales, que pueden responder de diferentes formas a un mismo estímulo (Ravetch, 1994).

Tradicionalmente, los Fc γ R se han vinculado con la capacidad inmunofagocítica de células efectoras como macrófagos y neutrófilos (Flesch *et al.*, 1998; Hunter *et al.*, 1993; Lobell *et al.*, 1994; Moura *et al.*, 1997; Sylvestre & Ravetch, 1994).

Sin embargo, también se ha observado su participación en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Voice & Lachmann, 1997), la producción del anión superóxido (Greenberg & Silvertein, 1993), el transporte de inmunoglobulina materna al feto a través de la barrera placentaria (Mostov, 1994; Vaughn *et al.*, 1997), la liberación de gránulos específicos en neutrófilos (Voice & Lachmann, 1997), la regulación de la producción de citocinas y de inmunoglobulinas (Muta *et al.*, 1994; Takai *et al.*, 1996) (Tabla 4).

Recientemente se describió el papel de los FcγR en la inducción de la apoptosis en algunos tipos celulares, tal es el caso de los linfocitos B, en donde el FcγRII induce apoptosis al unirse con su ligando (Pearse *et al.*, 1999; Sarmay *et al.*, 1999). Otro ejemplo lo constituyen las células NK, en donde la unión de FcγRIII a complejos inmunes o a anticuerpos monoclonales induce apoptosis.

Papel de los FcγR en la hematopoyesis

Se sabe que los receptores FcγR son más abundantes en células sanguíneas maduras (Minami *et al.*, 1996), pero también pueden estar presentes desde estadios tempranos en algunos tipos celulares hematopoyéticos, tales como células CD34+ (Lantz & Huff, 1995), células mast progenitoras derivadas de médula ósea (Wu *et al.*, 1996), células comprometidas hacia el linaje granulomonocítico (Olews *et al.*, 1995), progenitores de linfocitos T y B (de Andres *et al.*, 1998) y progenitores de células NK, provenientes de hígado fetal de ratón (Moingeon *et al.*, 1993).

El papel que juegan los FcγR en las células poco diferenciadas ha sido escasamente abordado. Se ha propuesto que los FcγR pueden favorecer la sobrevivencia de las células hematopoyéticas, como ha sido observado en células progenitoras dependientes de IL-3, en las cuales se ha descrito que el entrecruzamiento del receptor FcγRIII, a través de complejos inmunes, evita la apoptosis cuando la IL-3 es retirada del medio de cultivo (Yoshikawa *et al.*, 1996)

Tabla 4. Funciones biológicas de los receptores FcγR.

Función	FcγRI	FcγRII	FcγRIII
Fagocitosis	+	+	+
Generación de superóxidos	+	+	+
Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	+	+	+
Liberación de enzimas lisosomales	¿?	+	+
Liberación de TNFα	+	+	+
Liberación de IL-1	+	+	¿?
Liberación de IL-6	+	+	¿?
Favorecer la presentación de antígenos	+	+	+
Transporte de IgG materna al feto	+	+	¿?
Degranulación de neutrófilos	¿?	¿?	+
Inducción de apoptosis	¿?	+	+
Inhibición de apoptosis a través de la producción de IL-3	¿?	+	+
Inhibición de la proliferación	¿?	+	+
Modulación de procesos inflamatorios	¿?	+	¿?
Participación en la inmunidad activa y pasiva	+	¿?	+

El signo + indica la participación del receptor en determinada función; el signo ¿? indica que no se cuenta con información al respecto. CCDA, Citotoxicidad dependiente de anticuerpos; TNF-α, Factor de necrosis tumoral; IL-1, Interleucina-1, IL-6, Interleucina-6. Tomada y modificada de Van de Winkel & Capel, 1993.

Algo similar ha sido encontrado en progenitores de eosinófilos, en los cuales la unión de FcγRII a su ligando evita la apoptosis en ausencia de factores de crecimiento y prolonga su supervivencia (Kim *et al.*, 1999). En las células NK la unión de FcγRIII a los complejos inmunes, en presencia de IL-2, estimula la proliferación de las células NK, observándose una disminución en el número de células progenitoras NK (Moingeon *et al.*, 1993; Warren & Kinnear, 1999). Sin embargo, también se ha propuesto que la estimulación del FcγRII puede inhibir la proliferación de células mast, deteniéndolas en la fase G1 del ciclo celular (Malbec *et al.*, 1999).

Sobre el papel que los FcγR desempeñan en la diferenciación celular, los trabajos son muy escasos. Se sabe que estos receptores son más abundantes a medida que las células son más maduras. Pero aún no hay datos que apoyen la idea de que los FcγR por sí mismos puedan favorecer la diferenciación celular.

Otra actividad atribuida a los FcγR es su posible participación en el desarrollo y función de los linfocitos T. Se ha demostrado que antes de la aparición de marcadores como CD4, CD8 y TCR, los timocitos fetales del día 14-17 expresan FcγRIII, y que estas células, si dejan de expresar el FcγRIII, se pueden desarrollar hasta linfocitos T CD4+ o CD8+, si son mantenidos en el microambiente tímico, o en células NK, si son removidas del timo y siguen expresando FcγRIII (Moingeon *et al.*, 1993). Algunos estudios han sugerido la posibilidad de que la expresión del FcγRIII, y su interacción con un ligando aún no bien caracterizado, constituyan una señal temprana de desarrollo para linfocitos T y células NK.

Respecto a las células mieloides, hasta ahora sólo se ha propuesto que el FcγRI puede estar relacionado con la evolución de la diferenciación celular, ya que aparece cuando las células CD34+ de médula ósea dejan de ser multipotenciales, y se comprometen al linaje granulo-monocítico (Olewus *et al.*, 1995). Sin embargo, no hay evidencias de que este receptor sea el responsable de la diferenciación celular, más bien parece que su expresión es consecuencia del nivel de diferenciación de las células.

Papel de los FcγR en la salud y enfermedad

Se ha demostrado que a través de los receptores FcγRI y FcγRII, se puede favorecer la expresión de antígenos, por lo que se plantea la posibilidad de estimular a estos receptores como una estrategia para aumentar la eficiencia de las vacunas (Heijnen *et al.*, 1996; McKenzie & Schreider, 1994).

Se sabe que los receptores FcγR, junto con algunos componentes del sistema del complemento, células cebadas y neutrófilos, participan en procesos inflamatorios, que llevan a la hemorragia, edema y destrucción de tejidos (Takai *et al.*, 1996; Sylvestre & Ravetch, 1994), siendo estas actividades parte fundamental de la patogenia de enfermedades como el lupus eritematoso y la artritis reumatoide

Además de su participación en diversos mecanismos relacionados en la defensa contra agentes patógenos, y en la regulación de la respuesta inmune, se ha demostrado que los FcγR pueden actuar como puntos de entrada para ciertos agentes infecciosos, o que están implicados en la etiología de algunas enfermedades (Wallace *et al.*, 1994). Tal es el caso del virus del Dengue, cuya replicación parece estar restringida a células FcγR+ del linaje mononuclear, y del virus del VIH-1, cuya infección sobre monocitos y macrófagos aumenta por acción de los FcγR, los cuales incrementan el contacto de la célula con el virus a través de anticuerpos, y de esta manera contribuyen a aumentar la infección (Van de Winkel & Capel, 1993).

Por otro lado, se sabe que alteraciones en los niveles de expresión de los FcγR, se asocian con ciertas enfermedades o trastornos inmunológicos, tales como enfermedades cutáneas (Petzelbauer & Groger, 1997) o infecciones bacterianas (Burova *et al.*, 1997). Por ejemplo, una disminución en la expresión del FcγRII soluble, se correlaciona con un mayor riesgo a contraer infecciones en pacientes neutropénicos. En monocitos de pacientes con Lupus eritematoso sistémico, se ha demostrado que el número de FcγR se encuentra aumentado, y que la expresión de ciertas formas polimórficas o alélicas del FcγRII, se asocian con enfermedades renales en estos pacientes (Sarmay, 1999). De forma semejante, se ha observado que en pacientes con mieloma múltiple los niveles de FcγRIII se encuentran alterados. También se ha propuesto que el FcγRIIb1 de ratón puede estar involucrado en el desarrollo de tumores, ya que éste puede actuar como un factor que aumenta la progresión cuando se expresa ectópicamente en células tumorales no linfoides (Moldovan, 1999).

Se ha demostrado que en linfocitos presentes en fluidos sinoviales, la presencia de TGF-β induce la expresión del FcγRIII, y que la transducción de señales a través de este receptor lleva a la liberación de superóxidos, que pueden contribuir al daño tisular y provocar algunas otras secuelas postinflamatorias (Moldovan, 1999).

Citocinas inductoras de la expresión de FcγR

Considerando el importante papel de los FcγR, tanto en condiciones normales como patológicas, resulta interesante conocer los factores y mecanismos que regulan la expresión de estos receptores. Las primeras investigaciones demostraron que el sobrenadante de linfocitos activados con concanavalina A, inducía la expresión de los FcγRs. A partir de estos resultados se postuló que la regulación de la expresión de estos receptores podía estar controlada por citocinas o factores de crecimiento (Vogel & Rosenstreich, 1979).

Actualmente se sabe que las principales citocinas inductoras de receptores FcγR en células maduras son el IFN γ , el G-CSF y el M-CSF (Tabla 5). El IFN γ induce un pronunciado incremento de receptores FcγRI en células del linaje monocito-macrófago (Becker & Daniel, 1990; Sivo *et al.* 1993; Wilson & Finbloom, 1992), tanto en adultos como en recién nacidos (Fairchild *et al.* 1996), al igual que en líneas celulares como U-937, HL-60, IC21 y P388 (Perussia *et al.* 1983; Flores, 1997). El IFN γ también induce FcγRI en neutrófilos (Cassatella *et al.* 1990; Carulli *et al.* 1996) y en células glomerulares (Uciechowski *et al.* 1998). Este mismo factor no afecta la expresión de FcγRII, ni en neutrófilos ni en monocito-macrófagos, pero induce al FcγRIII en eosinófilos y monocitos (Weinshank *et al.* 1988), y también aumenta su expresión en neutrófilos (Hoffmeyer *et al.* 1997), en particular, de la forma no transmembranal de FcγRIII (Carulli *et al.* 1996).

El G-CSF favorece la expresión de FcγRI en neutrófilos (Gerike *et al.* 1995), induciendo la unión de activadores de la transcripción a la región de respuesta a IFN γ , dentro del promotor del gene para FcγRI (Bovolenta *et al.* 1996). Esta citocina también induce la expresión de FcγRI en células mieloides, diferenciadas a partir de precursoras de médula ósea CD34+ (Kerst *et al.*, 1993). El G-CSF también induce la forma no transmembranal de FcγRIII en neutrófilos pero no en monocitos.

Tabla 5. Principales inductores de receptores FcγR en células normales y leucémicas.

Tipo celular	Nivel de diferenciación	Receptor inducido	Inductor
Células CD34+ Purificadas	poco diferenciadas	FcγRI FcγRII	G-CSF G-CSF
Médula ósea Enriquecida con progenitores	poco diferenciadas	FcγR no definido	IL-1β, MCMac
Monocitos	Diferenciados	FcγRI FcγRIII FcγR no definido	IFNγ, M-CSF IFNγ, G-CSF IL-1β
Macrófagos	Diferenciados	FcγRI FcγRII FcγR no definido	IL-1β, IFNγ, M-CSF IL-1β MCMac, IL1-α, M-CSF
Neutrófilos	Diferenciados	FcγRI FcγRIII	IFNγ, G-CSF IFNγ, G-CSF, GM-CSF
Células glomerulares	Diferenciadas	FcγRI	IFNγ
Eosinófilos	Diferenciados	FcγRIII	IFNγ
U-937	Leucemia monocítica	FcγRI FcγR no definido	IFNγ IL-1β
IC21	Leucemia macrofágica	FcγRI FcγRII	IL-1β, IFNγ IL-1β
P-388	Leucemia macrofágica	FcγRI FcγRII	IL-1β, IFNγ IL-1β
HL-60	Leucemia mielomonocítica	FcγRI	IFNγ
Wehi 3B	Leucemia Promielocítica	FcγR no definido	IL-1β
M1	Leucemia mielomonocítica	FcγRI	IL-6
WR19M.1	Leucemia macrofágica	FcγR no definido	IL-1β

IL-1β (interleucina-1 beta), IL-1α (interleucina-1 alfa); IL-6 (interleucina-6); IFNγ (interferón gamma); G-CSF (Factor estimulador de colonias de granulocitos); M-CSF (Factor estimulador de colonias de macrófagos); GM-CSF (Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos); MCMac (Medio condicionado de macrófagos) (Becker et al. 1987; Carulli et al. 1996; Ericson et al. 1994; Flores, 1997; Gerike et al. 1995; Hoffmeyer et al. 1997; Kerst et al. 1993; Onazaki et al. 1987, 1988; Rhul & Pluznick, 1993; Santiago, 1996; Uciechowski et al. 1998)

Sobre el M-CSF se tienen algunos datos contradictorios, se ha observado que esta molécula tiene un efecto inhibitorio sobre la expresión de FcγRI en monocitos humanos, pero en estas mismas células, mantenidas en cultivo por tres días, se observa un aumento en la expresión del receptor en respuesta al M-CSF. Algo similar ocurre con macrófagos peritoneales de ratón (Maggee *et al.*, 1987).

El GM-CSF induce la expresión de FcγRII en células precursoras hematopoyéticas después de 48 horas de cultivo, en las cuales la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) se correlaciona con el incremento de FcγRII, lo cual sugiere que este receptor sea el responsable de la actividad citotóxica de las células maduras (Ericson *et al.*, 1994).

También se sabe que el GM-CSF participa en la activación y desactivación de FcγRII en eosinófilos humanos. El GM-CSF tiene el mismo efecto que el G-CSF sobre la expresión de FcγRIII (Koenderman *et al.*, 1993).

La IL-6 induce la expresión de FcγRI en la línea de células leucémicas de ratón M1 (Rhul & Pluznick, 1993).

Se ha demostrado que la interleucina-1 puede inducir un incremento en la expresión de FcγR en células leucémicas (Onazaki *et al.*, 1987, 1988), en particular induce un incremento en la expresión de FcγR en células de tipo macrófago, derivadas tanto de humano como de ratón. Dicha estimulación parece ser específica, ya que no ha sido observada en otros tipos celulares como por ejemplo granulocitos-neutrófilos o linfocitos (Santiago, 1996).

Otros trabajos indican que la IL-1 induce FcγRI y FcγRII en las células IC21 y P388 (Flores, 1997). Hasta el momento no existen datos que indiquen si esta citocina puede inducir la expresión de receptores FcγR en células hematopoyéticas multipotenciales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los receptores para la fracción cristalizante de la inmunoglobulina G (Fc γ R) juegan un papel importante en la defensa del organismo, particularmente en la eliminación de complejos inmunes. Es conocido que un incremento en la expresión de receptores Fc correlaciona con un mayor grado de diferenciación morfológica, además de una reducción en la capacidad de proliferación. Este efecto se presenta no sólo en células comprometidas, sino también en células precursoras (Ericson, *et al.*, 1994; Kerst *et al.*, 1993).

Recientemente se demostró que la interleucina-1 beta (IL-1 β), una proteína multifuncional, que es producida por una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo células mieloides (monocito-macrófagos y granulocito-neutrófilos), tiene la propiedad de inducir la expresión de Fc γ R en células sanguíneas tanto normales como leucémicas (Flores, 1997; Onozaki *et al.*, 1988; Santiago, 1996). Sin embargo, se desconoce si la IL-1 tiene este mismo efecto sobre células primitivas y, de ser así, si esta expresión se acompaña de algún cambio en la morfología o en la capacidad proliferativa de estas células, ya que recientemente se ha demostrado que esta citocina puede inhibir la proliferación de células mieloides primitivas (Ogawa, 1999; Yonemura *et al.*, 1996)

Por ello, el presente trabajo tiene como finalidad evaluar si la IL-1 induce la expresión de receptores Fc γ R en células progenitoras mieloides y si esta expresión se correlaciona con cambios morfológicos y con una disminución en la capacidad proliferativa, utilizando para ello la línea mieloides multipotencial 32D de ratón, la cual es dependiente de IL-3. Los resultados que se generen contribuirán a una mejor comprensión del papel que tiene la IL-1 sobre la hematopoyesis y su participación en la respuesta inmune a través de la inducción a la expresión de receptores Fc.

HIPOTESIS

Se sabe que la interleucina-1 beta (IL-1 β) induce la expresión de receptores Fc γ R en células maduras, normales y leucémicas, de linaje mielóide, además de regular negativamente la proliferación de algunos tipos celulares, incluyendo células progenitoras hematopoyéticas. La exposición de la línea celular mielóide multipotencial 32D Cl3 de ratón a la IL-1 β , permitirá evaluar el efecto de esta citocina en la expresión de receptores Fc γ R en células progenitoras mieloides, así como en la diferenciación morfológica y la capacidad proliferativa de dichas células.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la interleucina-1 beta recombinante humana (IL-1 β) induce la expresión de receptores Fc γ R en la línea celular mielóide primitiva 32D Cl3, y si esta expresión se acompaña de diferenciación morfológica y/o de cambios en la capacidad proliferativa.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la concentración y tiempo mínimo de exposición a rhIL-1 β , para inducir la expresión de los receptores Fc γ R en la línea celular 32D Cl3.
2. Evaluar si la expresión de receptores Fc γ R confiere actividad inmunofagocítica a éstas células.
3. Evaluar si la expresión de receptores Fc γ R en la línea celular 32D Cl3, se acompaña de diferenciación morfológica o de actividad citoquímica específica, hacia linaje monocítico-macrófago o granulocito-neutrófilo
4. Determinar el efecto de la IL-1 β sobre la capacidad proliferativa y la viabilidad de ésta línea celular.

METODOLOGIA

Células

Para este trabajo se utilizaron células de la línea mieloide primitiva 32D Cl3 de ratón, dependiente de interleucina-3 (IL-3), las cuales fueron donadas por la Dra. T. Hoang (Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, Montreal, Canadá). Las células se mantuvieron en cultivo a una temperatura de 37°C, bajo una atmósfera de 5% de CO₂ y humedad relativa al 95%, en medio Iscoves Modified Dulbecco's (Gibco BRL, USA) y en presencia de 10% de suero fetal de bovino (GibcoBRL, USA), previamente desactivado a 56°C. Todos los cultivos y ensayos se realizaron en presencia de 0.5 ng/ml de IL-3 (R&D, USA), a menos que se señale lo contrario.

Citocinas recombinantes

Para este trabajo se utilizó Interleucina-1beta recombinante humana (rhIL-1 β), Interferón-gamma recombinante de ratón (rmIFN- γ) e Interleucina-3 recombinante de ratón (rmIL-3), obtenidas de R&D System, USA. Todas las citocinas fueron reconstituidas en PBS (Apéndice) al 0.1 % de albúmina sérica de bovino, alicuotadas y almacenados a -70°C hasta su uso.

Preparación de eritrocitos opsonizados con anticuerpo

Los eritrocitos de carnero (EC) se obtuvieron por punción en la yugular de un carnero. La sangre obtenida fue resuspendida en un volumen similar de Solución de Alsever (Apéndice) en la que se pueden mantener a 4°C hasta por 20 días.

Primeramente se determinó la concentración óptima de anticuerpo para opsonizar a los eritrocitos de carnero. En una placa de microtitulación de 96 pozos (Nuncclon, USA) se realizaron diluciones seriadas (desde 1:10 hasta 1:3000) en amortiguador de fosatos (PBS, Apéndice) de una solución de anticuerpo de conejo anti-IC (Sigma, USA), a 50 μ l de cada

una de estas diluciones se agregó 50 μ l de una solución de EC al 2% en PBS , se resuspendió y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Por análisis visual se eligió como concentración óptima de anticuerpo, el título subaglutinante de los EC. La opsonización de los eritrocitos de carnero se realizó incubando EC al 2% con la concentración óptima de anticuerpo (por lo regular concentraciones entre 1:300 y 1:600) durante 2 horas a temperatura ambiente.

Los eritrocitos activados de esta forma fueron guardados a 4°C y se usaron durante los primeros tres días después de su preparación. Una vez transcurrido este tiempo fueron preparados nuevamente.

Elaboración de curvas dosis-respuesta para la expresión de Fc γ R

Para determinar la concentración de citocina requerida para observar la inducción de la expresión de los Fc γ Rs, se elaboró una curva dosis-respuesta. Brevemente, se cultivaron células 32D en cajas de 96 pozos (Nunc, USA) en una concentración de 10^5 células/ml (2×10^4 células / pozo) en presencia o ausencia de 0.01, 0.1, 1, 5, 20, 50, 100 ng/ml rhIL-1 β o 50 U/ml de rmIFN γ como testigo positivo, durante 48 horas.

Una vez transcurrido este tiempo se procedió a la evaluación de la expresión de receptores Fc γ R por medio de la técnica de rosetas con eritrocitos de carnero activados con anticuerpo (EA).

Evaluación de la expresión de receptores Fc γ R por EA

La expresión de los receptores Fc γ R se evaluó a través de la técnica de formación de rosetas con eritrocitos de carnero opsonizados con anticuerpo (IgG). Brevemente, las células en presencia o ausencia de estímulo se transfirieron a un tubo eppendorff para centrifugarse a una velocidad de 3500 rpm durante 5 minutos.

Posteriormente, se eliminó el medio de cultivo y el botón celular se resuspendió en 180 μ l de PBS, enseguida se adicionaron 20 μ l de solución de eritrocitos de carnero cubiertos con anticuerpo y esta suspensión fue centrifugada a 1500 rpm durante 1 minuto. A continuación se incubó a 37°C durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se resuspendió ligeramente el botón celular, y se procedió a evaluar el número de células con eritrocitos de carnero adheridos, por medio de un hemocitómetro y un microscopio invertido. Células con más de tres eritrocitos adheridos se consideraron positivas. Para cada muestra se contaron un mínimo de 200 células.

Elaboración de curvas tiempo-respuesta

La concentración óptima para inducir la expresión de Fc γ R, fue utilizada para determinar la expresión de estas moléculas respecto al tiempo de estímulo. Se cultivaron células 32D en cajas de 96 pozos (Nunc, USA), en una concentración de 10^5 células/ml (2×10^4 células / pozo) en presencia o ausencia de 50 ng/ml rhIL-1 β o 50 U/ml de rmlFN γ durante 0, 3, 6, 12, 24 y 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a la evaluación de la expresión de receptores Fc por medio de la técnica de rosetas con eritrocitos de carnero activados con anticuerpo (EA).

Fagocitosis de eritrocitos cubiertos con anticuerpo

Células 32D fueron cultivadas en una placa de 96 pozos (10^5 células/ml), en presencia o ausencia de 50 ng/ml rhIL-1 β o 50 U/ml de rmlFN γ durante 12, 24 y 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de cultivo, las células fueron transferidas a un tubo eppendorf y se retiró el medio por centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos. El botón celular fue resuspendido en 180 μ l de PBS, a ésta suspensión se adicionaron 20 μ l de solución de EA. Se centrifugó a 1500 rpm y se incubó a 37°C durante 1 hora.

Concluido el tiempo de incubación, se centrifugó a 3500 rpm y el sobrenadante se eliminó. Se lavó dos veces con PBS (para eliminar los eritrocitos no adheridos), y después del segundo lavado el botón celular fue resuspendido en 1 ml de buffer de lisis para

eritrocitos (Apéndice) y se centrifugó a 3500 rpm durante 3 minutos. Se lavó una vez más con solución de fosfatos y se resuspendió en un volumen final de 200 μ l de PBS.

Se contó el número de células que mostraban eritrocitos internalizados y el número de células que no exhibían eritrocitos internalizados, para determinar el porcentaje correspondiente. Como control positivo de inmunofagocitosis se utilizaron las células P388. Se consideró que una célula era positiva cuando había internalizado por lo menos 3 eritrocitos. Para cada muestra se contaron un mínimo de 200 células.

Diferenciación Morfológica

Se evaluó la diferenciación morfológica mediante la preparación de frotis, fijados con metanol absoluto y teñidos con Giemsa (Sigma, USA) (Apéndice 3), estableciéndose los porcentajes de células diferenciadas hacia monocitos, células en banda o células segmentadas, distinguiendo los blastos de los estados diferenciados por su tamaño, forma del núcleo y la proporción núcleo/citoplasma (Greenblatt & Elias, 1992; Harris *et al.*, 1998; Hayashi *et al.*, 1994).

Caracterización citoquímica

Para caracterizar la diferenciación citoquímica de las células 32D, se cultivaron células en presencia o ausencia de rhIL-1 β (50 ng/ml) o de rmIFN γ (50 U/ml) durante 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de cultivo se utilizó la técnica de identificación para granulocitos y para monocito-macrófagos (Apéndice) (Isoda *et al.*, 1997; Migliaccio *et al.*, 1989; Zucker *et al.*, 1988), utilizando como controles positivos granulocitos de médula ósea de ratón y células P388 respectivamente.

Ensayos de proliferación

Para evaluar el efecto de la IL-1 β sobre la proliferación de la línea celular 32D Cl3, se cultivaron 10⁵ células en placas de 96 pozos (Nunc, USA), en presencia o ausencia de

diferentes concentraciones de rhIL-1 β o rmIFN γ , durante 48 horas y se procedió a evaluar el número celular por conteo directo utilizando un hemocitómetro.

Adicionalmente se evaluó la proliferación de la línea celular 32D por medición de la incorporación de timidina, para ello se realizó una variación del protocolo previamente descrito (Zentella et al. 1991). Brevemente, se cultivaron 10⁶ células/ml en placas de 24 pozos (Nuncclon, USA) en presencia o ausencia de rhIL-1 β ó de rmIFN γ y 1 μ Ci/ml de timidina tritiada (Amersham) durante 48 horas.

Una vez transcurrido el tiempo, las células fueron transferidas a un tubo eppendorff y centrifugadas a 3500 rpm durante 5 minutos. El medio fue eliminado y el botón celular fue resuspendido en 1 ml de PBS, y lavado dos veces con centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos. Enseguida el botón celular fue lisado en 0.5 ml de hidróxido de sodio (NaOH) 800 mM y refrigerado a 4°C durante 24 horas.

La solución de NaOH de cada uno de los tubos se colocó de manera individual con 2 ml de líquido de centelleo (Beckman, USA), en viales para contador de centelleo. La emisión de luz fue cuantificada como cuentas por minuto (CPM) durante 1 minuto en un contador de centelleo (Beckman, USA, modelo LS 6000SE).

Viabilidad celular por exclusión con azul de tripano

La viabilidad de las células en cultivo, con o sin la presencia de citocina, fue evaluada por la técnica de exclusión con azul de tripano (Sigma, USA), utilizando una proporción 1:1 de colorante y de muestra celular respectivamente, y presentada como el porcentaje de células vivas (no teñidas con el colorante), como se describe previamente (Rodel & Link, 1996; Tanaka *et al.*, 1993).

Evaluación de apoptosis por la reacción tunel

El porcentaje de células apoptóticas presentes en los cultivos fue evaluada a través de la reacción tunel (Lin et al. 1996). Se cultivaron 1.5×10^5 células/ml en presencia o ausencia de 50 ng/ml de rhIL-1 β o 50 U/ml de rmIFN γ en un volumen total de 5 ml, en cajas de Petri de 5 ml durante 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo el botón celular fue colectado por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos, y lavado tres veces con una solución de albúmina sérica de bovino desionizada al 1% en PBS (solución PBA), centrifugando en cada caso a 3000 rpm durante 5 minutos. Enseguida se pasó el botón a un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo y estéril y se centrifugó a la misma velocidad.

El botón así obtenido se fijo en 200 μ l de formaldehído al 3% durante 5 minutos a temperatura ambiente. La suspensión fue centrifugada a 3000 rpm y el botón obtenido se resuspendió en 1 ml de solución PBA (PBS al 1% de BSA desionizada, Apéndice). Nuevamente se centrifugó a 3000 rpm y se eliminó el sobrenadante, enseguida se adicionaron 150 μ l de tritón X-100, refrigerando 2 minutos a 4°C. A continuación se lavó 2 veces con 1 ml de solución PBA. Posteriormente, se adicionaron 37 μ l de agua esteril, 10 μ l de TdT 5X, 1.2 μ l de una dilución 1: 4 de dUTP-biotin, 1 μ l de dATP y 1 μ l de TdT. Se incubó 1 hora a 37°C en baño maría, con agitación cada 15 minutos. Transcurrido el tiempo, se adicionaron 2 μ l de EDTA 0.5 M y se lavó 2 veces con solución PBA. Se agregaron 99 μ l de PBA y 1 μ l de Streptavidina, incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se repitió el lavado 2 veces con 1 ml de solución PBA.

El botón fue resuspendido en 25 μ l de solución PBA, y de ahí se tomaron 5 μ l que se colocaron en un portaobjetos limpio. Se dejó sedimentar 1 minuto y se cubrió con un cubreobjetos, cuidando el no dejar aire dentro. Los extremos fueron sellados y las células observadas con ayuda de un microscópio de fluorescencia.

Los datos presentados son resultado de por lo menos dos ensayos independientes con su repetición y se muestran como el promedio con su desviación estandar

RESULTADOS

1. La interleucina-1 β induce la expresión de receptores Fc γ R de manera dosis-dependiente en las células 32D.

Se evaluó la expresión de receptores Fc γ R en la línea celular 32D, cultivada durante 48 horas en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de rhIL-1 β . Los resultados indican que estas células presentan niveles basales de Fc γ R (alrededor de 4%), y que existe un incremento progresivo en su expresión a 8, 15, 17, 46 y 60 % con dosis de 1, 5, 20, 50 y 100 ng/ml de rhIL-1 β respectivamente (figura 6). Las concentraciones inferiores a 1 ng/ml no incrementaron la expresión de receptores Fc γ R.

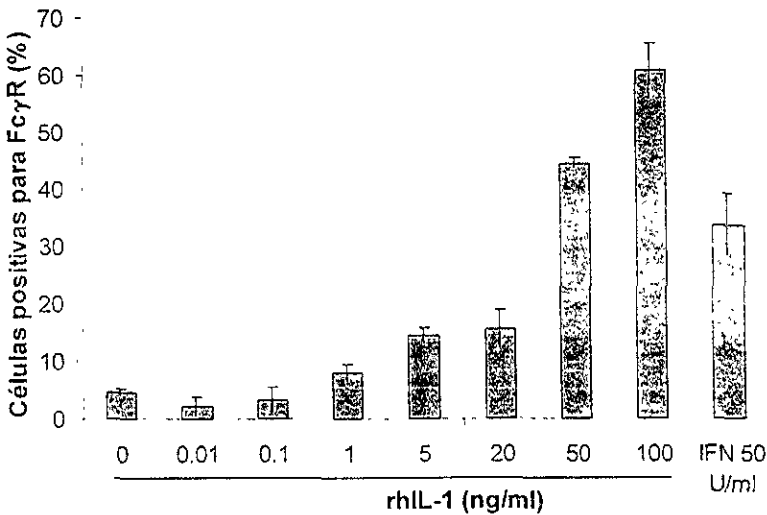


Figura 6. Expresión de receptores Fc γ R en células 32D cultivadas durante 48 horas en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de rhIL-1 β (ng/ml) o de 50 U/ml de rmIFN γ .

2. La expresión de Fc γ R promovida por la rhIL-1 β en las células 32D es tiempo-dependiente.

Se emplearon 50 ng/ml de rhIL-1 β para determinar el tiempo mínimo de exposición, requerido para observar el incremento en la expresión de receptores Fc γ R en las células 32D Cl3. Los cultivos en presencia de rhIL-1 β , muestran un incremento tiempo-dependiente en el porcentaje de células que expresan receptores Fc γ R. Desde las 3 horas de inducción ya se observa un incremento (12 %) con respecto al control (5 %). A las 12 y las 24 horas se alcanzan niveles de alrededor de 35 %, mientras que a las 48 horas se tiene hasta un 47 % (figura 7).

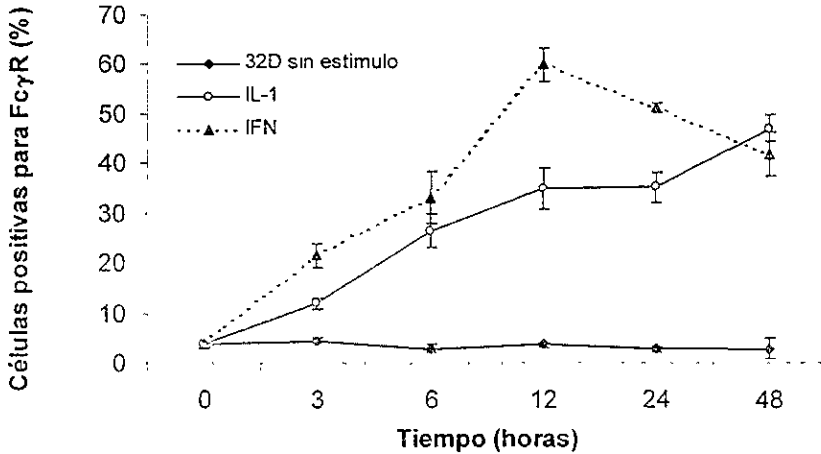


Figura 7. Expresión de receptores Fc γ R a través del tiempo en presencia o ausencia de rhIL-1 β (50 ng/ml) o de rhIFN γ (50 U/ml).

3. La formación de rosetas en las células 32D es dependiente de la presencia de eritrocitos cubiertos con anticuerpos.

Para confirmar que la formación de rosetas sólo se llevaba a cabo en presencia de eritrocitos activados y no por un evento de unión inespecífica, se evaluó la formación de rosetas en presencia o ausencia de eritrocitos cubiertos de IgG (EA), o de eritrocitos igualmente procesados pero sin anticuerpo (ES). Los resultados indican que la formación de rosetas, sólo se presentó en células tratadas con las citocinas y en presencia de eritrocitos cubiertos con anticuerpo (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de células positivas para FcγR en presencia de eritrocitos activados con anticuerpo (EA) o de eritrocitos sin anticuerpo (ES), después de 12 horas de estímulo.

	EA	ES
32D sin estímulo	4.33 +/- 0.81	0
RhIL-1β (50 ng/ml)	37.00 +/- 6.60	0
RmIFNγ (50 U/ml)	54.83 +/- 6.01	0

4. La expresión de receptores FcγR en las células 32D no les confiere propiedades inmunofagocíticas

Se determinó si la expresión de receptores FcγR le proporcionaba a las células 32D C13 la capacidad de inmunofagocitar eritrocitos de carnero cubiertos con anticuerpo. No se encontraron eritrocitos de carnero internalizados en las células sin estímulo, ni en aquellas en presencia de rhIL-1β o de rmIFNγ, aún después de 48 horas en presencia de las citocinas, a pesar de haberse encontrado altos niveles de rosetas. En cambio en las células P388, una línea que muestra inmunofagocitosis, se detectó tanto la presencia de altos niveles de rosetas como de inmunofagocitosis. La figura 8 y la tabla 7 muestran la ausencia de eritrocitos internalizados en las células 32D C13 a los 48 horas de estímulo.

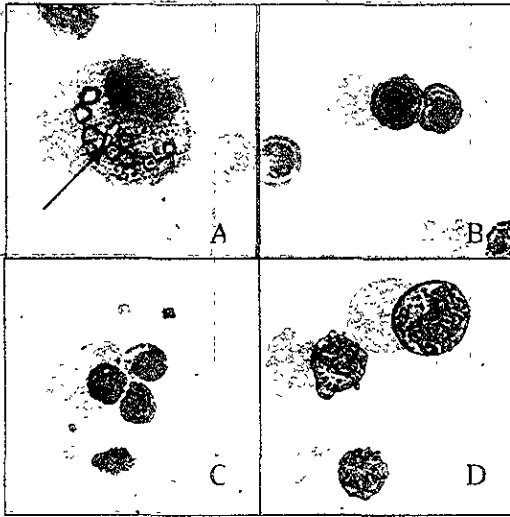


Figura 8. Inmunofagocitosis de eritrocitos de carnero activados con inmunoglobulina G (EA) por células P388 (A) y células 32D sin estímulo (B), o cultivadas durante 12 horas en presencia de 50 ng/ml de rhIL-1 β (C) o de 50 U/ml de rmIFN γ (D). Tinción con Giemsa. 40X.

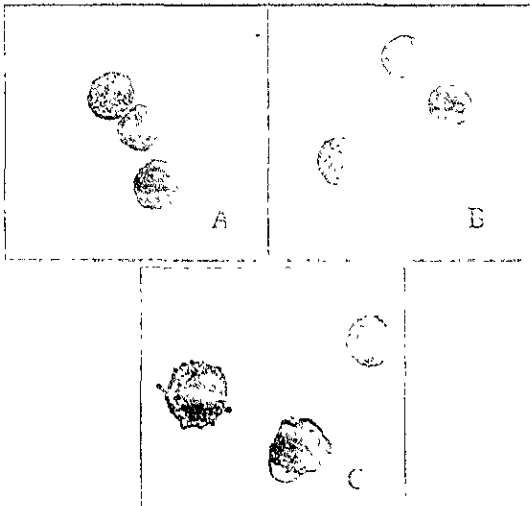


Figura 9. Inmunofagocitosis de eritrocitos de carnero activados con inmunoglobulina G (EA) por células P388 (A) y células 32D sin estímulo (B), o cultivadas durante 12 horas en presencia de 50 ng/ml de rhIL-1 β (C). Tinción con Giemsa. 40X.

Tabla 7. Inmunofagocitosis de EA por células 32D después de 48 horas en presencia o ausencia de IL-1 β .

	Células positivas para Rosetas (%)	Células positivas para Inmunofagocitosis (%)
32D sin estímulo	3 +/- 0.81	0
RhIL-1 β (50 ng/ml)	45.5 +/- 5.80	0
RmIFN γ (50 U/ml)	44.0 +/- 4.08	0
Línea celular P388	45.25 +/- 9.28	47.25 +/- 6.02

5. La expresión de Fc γ R inducida por IL-1 β en las células 32D, no se correlaciona con una diferenciación morfológica.

Dado que la expresión de receptores Fc γ R se considera un parámetro de diferenciación celular, ya que son abundantes en células que están en estadios terminales de diferenciación morfológica, se evaluó si las células que expresaban receptores Fc γ R presentaban algún cambio en sus características morfológicas.

Se encontró que las células provenientes de los cultivos en presencia de rhIL-1 β , al ser teñidos con Giemsa, no mostraron cambios morfológicos hacia algún linaje mieloide, aún después de 48 horas de estímulo (figura 9 y tabla 8), a diferencia de las células en presencia de rmIFN γ , donde un alto porcentaje de células se diferenciaron hacia el linaje monocito-macrófago.

Tabla 8. Porcentaje de células en diferentes estadios después de 48 horas en presencia o ausencia de rhIL-1 β .

	Blastos	Promonocitos	Monocitos	Banda	Segmentados
32D sin estímulo	96 +/- 1.18	3 +/- 0.49	0	1 +/- 1	0
rhIL-1 β	93 +/- 9.66	7 +/- 8	0	0	0
rmIFN γ	69 +/- 4.61	33 +/- 7	0	0	0

Puesto que no fue detectado algún cambio morfológico en las células estimuladas con rhIL-1 β , se procedió a analizar si existía un comprometimiento, ya sea hacia el linaje monocítico o granulocítico.

Los resultados obtenidos muestran que las células 32D presentan un porcentaje basal de positividad para la tinción con cloroacetato esterasa, específica para linaje granulocítico (alrededor de 25%) (Figura 10), y que este porcentaje se mantiene semejante hasta las 48 horas de cultivo en presencia o ausencia de rhIL-1 β . Algo similar se observó en presencia de rmIFN γ .

Por otra parte, la tinción con α -naftil acetato esterasa, específica para linaje monocítico, mostró que sólo hasta las 48 horas de cultivo en presencia de rhIL-1 β , existe un ligero incremento en el porcentaje de células positivas (10 %) con respecto al control sin estímulo (6 %) (figura 11). A diferencia de las células estimuladas con IFN γ , donde se presentó un fuerte incremento en el porcentaje de células positivas (80%), en el mismo tiempo de exposición.

6. La Interleucina-1 β inhibe la proliferación de las células 32D.

Puesto que las células maduras que expresan receptores Fc γ R también experimentan una reducción en su capacidad proliferativa, se procedió a evaluar si el incremento en la expresión de receptores Fc γ R se acompaña de una reducción en la capacidad proliferativa de las células 32D.

Después de 48 horas de estímulo, se observó una reducción en la proliferación de más del 60 % en los cultivos en presencia de 50 ng/ml de rhIL-1 β (figura 12). Este dato fue corroborado utilizando la técnica de incorporación de timidina tritiada, obteniendo resultados semejantes (figura 13).

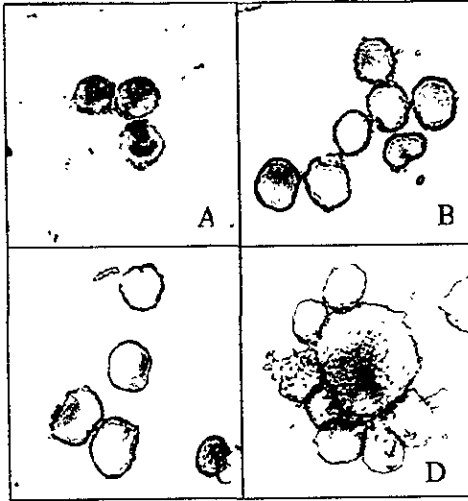


Figura 10. Tinción citoquímica específica con cloroacetato esterasa, para linaje granulocito-neutrófilo. Granulocitos de médula ósea (A) o células 32D después de 48 horas en ausencia (B), o presencia de 50 ng/ml de rhIL-1 β (C) o de 50 U/ml de rmIFN γ (D).

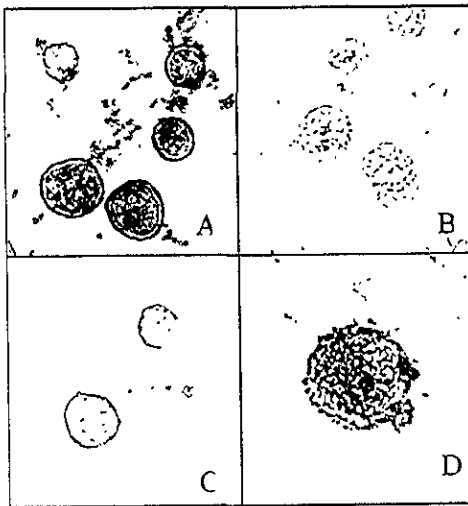


Figura 11. Tinción con α -naftil acetato esterasa, específica para linaje monocítico. Macrófagos de cavidad peritoneal de ratón (A) o células 32D después de 48 horas en ausencia (B), o presencia de 50 ng/ml de IL-1 β (C) o de 50 U/ml de IFN γ (D).

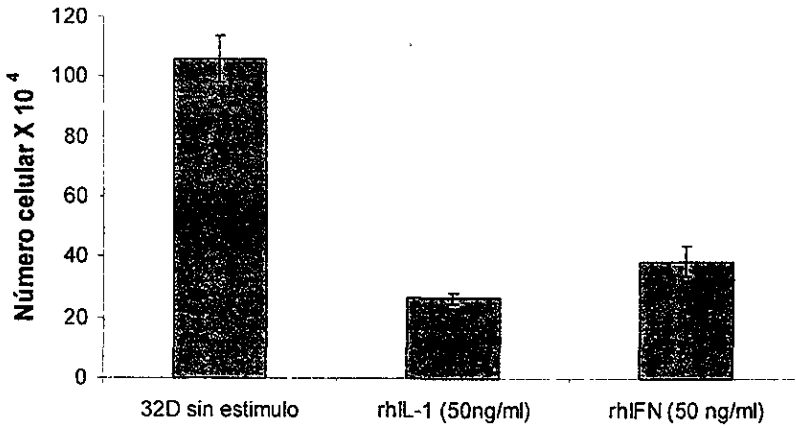


Figura 12. Proliferación de células 32D Cl3 después de 48 horas de cultivo, en ausencia o presencia de rhIL-1 β (50 ng/ml) o de rmIFN γ (50 U/ml).

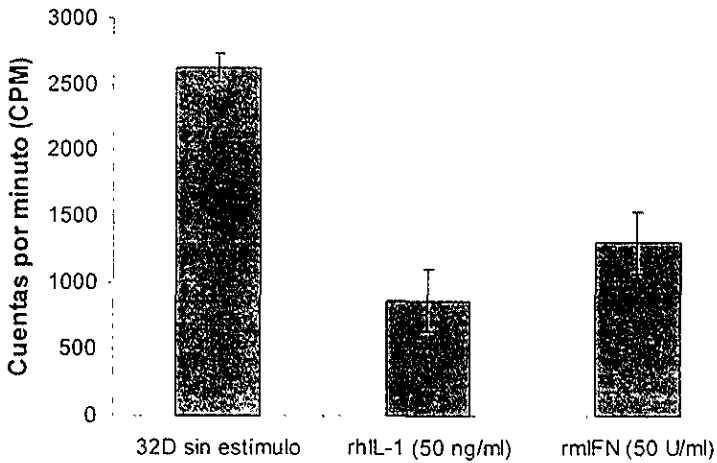


Figura 13. Incorporación de timidina tritiada en células 32D estimuladas con 50 ng/ml de IL-1 β o con 50 U/ml de IFN γ .

Para redondear estas observaciones, se determinó la concentración mínima de rhIL-1 β requerida para ver una disminución en la proliferación celular, utilizando para ello diferentes concentraciones de la citocina.

La IL-1 β inhibió la proliferación de las células 32D Cl3 desde concentraciones de 1 y 5 ng/ml, siendo las concentraciones de 50 y 100 ng/ml las que reducen más notoriamente el número celular (alrededor de un 70%) con respecto al control. Las concentraciones por debajo de 1 ng/ml no mostraron un efecto evidente sobre la proliferación (figura 14).

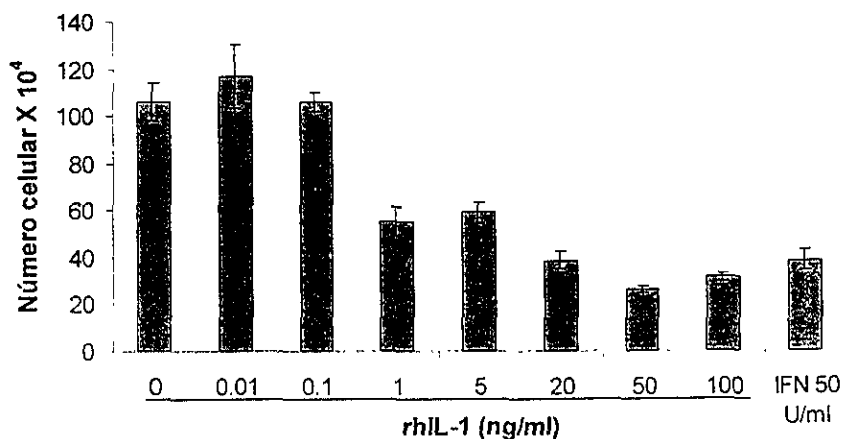


Figura 14. Curva de proliferación de 32D después de 48 horas en presencia de diferentes concentraciones de IL-1 β .

7. La reducción en la proliferación observada en las células 32D en presencia de rhIL-1 β no es debida a muerte celular.

La viabilidad de las células 32D Cl3 en presencia de la rhIL-1 β , evaluada por exclusión de azul de tripano, muestra que las células en presencia de las diferentes concentraciones de IL-1 β mantienen una viabilidad de alrededor del 90 % (figura 15).

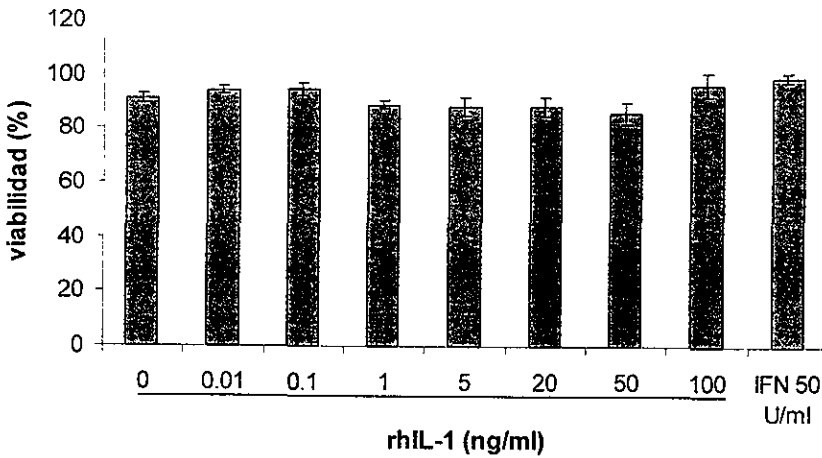


Figura 15. Viabilidad celular de 32D después de 48 horas de cultivo en presencia de diferentes concentraciones de rhIL-1 β .

Para reforzar el dato anterior, se estimuló a las células 32D con 50 ng/ml de rhIL-1 β y se evaluó el porcentaje de células apoptóticas por medio de la reacción tunel.

Los resultados señalan que las células en presencia de rmIL-3 y de rhIL-1 β mantienen un porcentaje muy bajo de células apoptóticas; mientras que aquellos cultivos en los que fue retirada la interleucina 3, se presentó un elevado porcentaje de células positivas para la reacción tunel, incluso en presencia de rhIL-1 β o de rmIFN γ (figura 16).

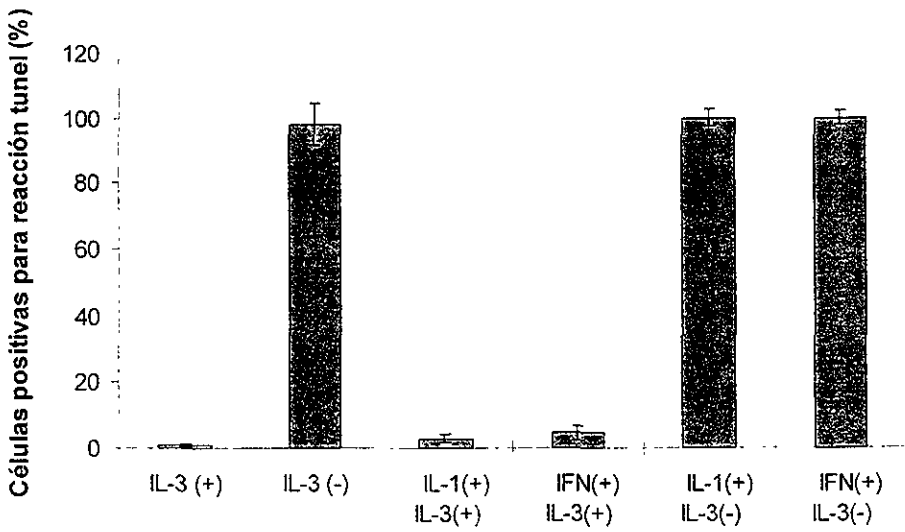


Figura 16. Porcentaje de células 32D positivas para apoptosis después de 48 horas de cultivo en ausencia (-) en presencia (+) de las diferentes citocinas. IL-3 0.5 ng/ml; IL-1 β 50 ng/ml; IFN γ 50 U/ml.

DISCUSION

Nuestros resultados muestran que la rhIL-1 β , tiene la capacidad de inducir la expresión de receptores Fc γ R en las células mieloides primitivas 32D Cl3, de manera dosis y tiempo-dependiente (Fig. 6 y 7), tal como ha sido observado en células mieloides maduras (Flores, 1997; Onozaki *et al.*, 1987; Santiago *et al.*, 1993); tanto así, que la expresión de receptores Fc γ R observada en las células 32D, a los dos días de cultivo en presencia de rhIL-1 β , es comparable con los datos descritos para macrófagos de ratón cultivados en las mismas condiciones (Santiago, 1996). Este dato resulta muy interesante ya que sugiere que las células progenitoras mieloides pueden expresar receptores Fc γ R, en la misma proporción que las células maduras.

El bajo porcentaje de células 32D Cl3 sin inductor, que expresan receptores Fc γ R, concuerdan con trabajos previos, que señalan la presencia de estos receptores en células progenitoras del tipo CD34 $^{+}$, así como en células mast progenitoras derivadas de médula ósea, las cuales expresan el receptor tipo II para la IgG (Fc γ RII), tanto a nivel de proteína como de mRNA (Lantz & Huff, 1995; Wu *et al.*, 1996). También se ha descrito la presencia de mRNA para el Fc γ RIII en células Mast progenitoras, sin embargo, el receptor no es expresado en la superficie de las células debido a que es degradado en el retículo endoplásmico (Lobell *et al.*, 1993) Por su parte, el Fc γ RI ha sido detectado sólo a partir de células comprometidas hacia linaje granulo-monocítico. Incluso se le ha propuesto como un marcador de este linaje (Olweus *et al.*, 1995).

Sin embargo, en estos trabajos la detección de los receptores se ha realizado con anticuerpos específicos (Kerst *et al.*, 1993; Olweus *et al.*, 1995), y en consecuencia se desconoce si esos receptores son capaces de reconocer complejos antígeno-anticuerpo. En este trabajo nosotros damos evidencias de que los receptores Fc γ R, expresados en las células mieloides multipotenciales 32D, tanto en niveles basales, como los inducidos por la rhIL-1 β , tienen la capacidad de unir complejos antígeno-anticuerpo, lo cual sugiere que

pueden estar participando activamente en el reconocimiento de antígenos. Aunque, según nuestros datos, no favorecen la inmunofagocitosis (Fig. 8), probablemente porque el resto de las moléculas involucradas en este proceso aún no están presentes (Green *et al.*, 1997; Jandl, 1991; Sambrano *et al.*, 1997; Wintrobe *et al.*, 1975).

Adicionalmente, nuestros datos señalan que la rhIL-1 β induce rápidamente la expresión de receptores Fc γ R en las células 32D (Fig. 7), desde las 3 horas de estímulo, lo cual podría ser significativo, dado que son capaces de reconocer células cubiertas con anticuerpos. Sin embargo, el papel que pudieran tener estos receptores no es muy claro por el momento, pero probablemente pueda estar relacionado con la sobrevivencia de las células primitivas, pues ya se ha demostrado que la presencia de los Fc γ R y la unión con su ligando, confiere resistencia a la apoptosis en células primitivas dependientes de IL-3, cuando esta citocina es retirada del medio de cultivo (Yoshikawa *et al.*, 1996). Otra hipótesis sobre la función que pueden tener los receptores Fc γ R en las células primitivas, fue planteada recientemente por Malbec y su grupo de trabajo (1999), quienes señalan que el receptor Fc γ R_{II}, puede estar participando activamente en la inhibición de la proliferación de células mast dependientes de factor de crecimiento.

Aún se desconoce el mecanismo por el cual la rhIL-1 β induce la expresión de receptores Fc γ R, pero debido a que esta citocina tiene la capacidad de promover la expresión de una amplia variedad de genes, incluyendo el propio (Dinarelli, 1994), puede tratarse de una inducción directa de los genes de los receptores Fc γ R, probablemente a través de algún factor de transcripción activado por la Proteína Kinasa C (PKC), cuya activación forma parte de la vía de transducción de señales desencadenada por la unión de la rhIL-1 β a su receptor (Brooks & Mizel, 1994), y de la cual se ha propuesto que participa en el incremento de receptores Fc γ R en células monocíticas (Hirose *et al.*, 1996).

Tradicionalmente, la expresión de receptores Fc γ R ha sido considerada una característica de diferenciación, ya que estos receptores son muy abundantes en células sanguíneas maduras (Minami *et al.*, 1996), o bien incrementan su expresión a medida que se lleva a cabo la diferenciación celular, tal como ocurre en células precursoras de médula

ósea CD34+, donde la expresión de receptores FcγR inducida por G-CSF, se acompaña de una diferenciación morfológica hacia el linaje granulocítico (Kerst *et al.*, 1993). Sin embargo, nuestros datos señalan que aún cuando la rhIL-1β induce fuertemente la expresión de receptores FcγR (Fig. 6 y 7), no tiene un efecto evidente sobre la diferenciación celular, ya que no fueron detectados cambios en las características morfológicas, ni citoquímicas de las células 32D estimuladas con rhIL-1β. (Fig. 9, 10, y 11), lo cual sugiere que la expresión de FcγR no es exclusiva de células maduras o en proceso de diferenciación como se ha planteado hasta ahora.

Cabe señalar que la IL-1 no ha sido descrita como una citocina diferenciadora, pues aún cuando promueve el fenotipo maduro de células endoteliales (Maier *et al.*, 1990), aparentemente por sí misma no tiene un efecto directo sobre la diferenciación de células hematopoyéticas, para ello requiere la adición de factores estimuladores de colonias como el M-CSF, para favorecer la diferenciación de células progenitoras de médula ósea hacia monocitos (Dinarelli, 1994; Orikasa *et al.*, 1993). Por lo cual, no es sorprendente que la presencia de esta citocina no haya sido suficiente para diferenciar a las células 32D Cl3. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que un mayor tiempo de exposición a la rhIL-1β, pudiera inducir un cambio morfológico, tal como ocurre en éstas células tratadas con GM-CSF, donde se requieren por lo menos 8 días de cultivo en presencia de la citocina, para observar una diferenciación morfológica (Valtieri *et al.*, 1987).

Nuestros resultados muestran que la rhIL-1β tiene un efecto inhibitorio de la proliferación en las células 32D, de hasta un 75 % a las 48 horas de estímulo, aún en presencia de rmIL-3 (Fig. 12 a 14), lo cual sugiere que la actividad proliferadora de rmIL-3 puede ser bloqueada por la rhIL-1β.

Desde la década de los 80's. Lovett (1986) y Onozaki (1987, 1988), dieron los primeros indicios de que la IL-1 podía inhibir la proliferación de células hematopoyéticas. Posteriormente, a principios de los 90's, Ayroldi y su equipo de trabajo (1992), sugirieron que la actividad inhibitoria de la proliferación, inducida en células leucémicas por moléculas como el LPS o el IFNγ, es mediada por la IL-1. Adicionalmente, Kindler y

colaboradores (1991), señalaron que la IL-1 tenía la capacidad de reducir hasta en un 75% la proliferación de células AML-193, dependientes de GM-CSF, a los 5 días de estímulo. Ahora nosotros damos las primeras evidencias de que una reducción similar se presenta en las células mieloides 32D dependientes de IL-3, pero en sólo 2 días, y que esta reducción en la proliferación puede presentarse de manera paralela a la expresión de receptores FcγR (Fig. 6 y 14).

El efecto inhibitorio de la hematopoyesis descrito en esta tesis, apoya trabajos recientes donde se propone que esta citocina reduce la capacidad proliferativa de las células progenitoras hematopoyéticas (Ogawa, 1996; Ogawa & Matsunaga, 1999), y las limita para reconstituir a ratones irradiados letalmente (Jazwiec *et al.*, 1998; Yonemura *et al.*, 1996). Sin embargo, estos datos contrastan con la mayoría de los reportes generados hasta el momento, en los que se propone que esta citocina promueve la proliferación de células hematopoyéticas primitivas, y con ello favorece la recuperación de ratones irradiados (Dinarelo, 1994; Fibbe & Falkenburg, 1990; Jovicic *et al.*, 1996; Kennedy & Borch, 1999; Snoeck *et al.*, 1994). Esta controversia abre la posibilidad de que la IL-1 tenga un papel dual, tanto inductor como inhibidor de la proliferación, por lo que sería interesante estudiar bajo que condiciones ocurre uno u otro proceso.

Una posible explicación del efecto dual de la IL-1 puede ser la dosis empleada, tal como ocurre en células endoteliales, donde bajas concentraciones de la citocina inducen la proliferación y altas concentraciones la inhiben (Cozzolino *et al.*, 1990). En el caso particular de la hematopoyesis, un efecto similar se presenta en la liberación de granulocitos al torrente sanguíneo, donde la inyección de 1 µg/ml de IL-1 en animales y humanos, incrementa el número de granulocitos circulantes (Ulich *et al.*, 1987), mientras que con dosis altas se desencadena una granulocitopenia (Shieh *et al.*, 1990).

Nuestros datos indican que la reducción en el número celular de la línea 32D, observada en presencia de la rhIL-1β, no es consecuencia de una disminución en la viabilidad, ya que ésta se conserva por encima del 90 % en todos los ensayos en presencia o ausencia de la rhIL-1β (Fig. 15), y tampoco es debida a apoptosis (Fig. 16), lo cual descarta

la posibilidad de que la rhIL-1b tenga un efecto citotóxico sobre estas células. Estos resultados sugieren que es indispensable reconsiderar el papel de la IL-1, como posible regulador negativo de la hematopoyesis.

El mecanismo implicado en la inhibición de la proliferación de las células hematopoyéticas, inducida por IL-1, aún no ha sido descrito en los tipos celulares en los que se ha observado. Sin embargo, se sabe que la unión de IL-1 a su receptor puede inducir la formación de Diacilglicerol (DAG) (Dinarelo, 1994), y que éste en presencia de calcio puede activar a la proteína cinasa C (PKC) (O'Neill *et al.*, 1990), la cual participa de forma importante en la inhibición de la proliferación de células hematopoyéticas dependientes de IL-3 (Chaikin *et al.*, 1990). Esta vía es semejante a la que se ha propuesto para explicar la inhibición de la proliferación de células hematopoyéticas, inducida por el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), el cual comparte muchas características con la IL-1 (Dinarelo, 1994), por lo que no sería extraño que pudiesen compartir la misma vía de inhibición de la proliferación en células hematopoyéticas. Asimismo, existe la posibilidad de que en esta vía sean inhibidas proteínas como *Wnt-1*, *Wnt-5a* ó *Wnt-10b*, las cuales participan activamente en la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas (Austin *et al.*, 1997).

La posible participación de PKC en la vía de señalización de IL-1, podría explicar el hecho de que a medida que aumenta la inhibición en la proliferación observada en 32D, se presente un fuerte incremento en la expresión de receptores FcγR (gráficas 1 y 8), ya que esta proteína participa en ambos eventos en células hematopoyéticas (Chaikin *et al.*, 1990; Hirose *et al.*, 1996).

La diferenciación de células mieloides primitivas se caracteriza por una reducción en la capacidad de proliferación, y transición de células de forma blástica hacia formas maduras, acompañada de la expresión de enzimas y moléculas de superficie celular como los receptores FcγR. En este trabajo demostramos que la IL-1 es capaz de inhibir la proliferación, y promover la expresión de receptores FcγR, sin inducir diferenciación morfológica o citoquímica, con lo cual se abre la posibilidad de reconsiderar si ambos parámetros (la reducción en la proliferación y la expresión de receptores FcγR

verdaderamente son indispensables durante la diferenciación de las células hematopoyéticas, o si pueden presentarse de manera independiente, lo cual daría pie a reconsiderar la relación que actualmente se ha planteado entre la expresión de receptores FcγR, la reducción en la proliferación y la diferenciación de células hematopoyéticas.

Resta por definir los procesos moleculares, por los cuales la rhIL-1β induce la expresión de receptores FcγR y la inhibición de la proliferación celular, lo cual habrá de realizarse como el siguiente paso para comprender de forma más integral el papel de la rhIL-1β en la hematopoyesis.

CONCLUSIONES

- La Interleucina-1 beta recombinante humana (rhIL-1 β), induce la expresión de receptores Fc γ R de forma dosis y tiempo-dependiente, en la línea celular mielóide primitiva 32D Cl3.
- Los receptores Fc γ R expresados en las células 32D tienen la capacidad de unir complejos antígeno-anticuerpo, pero no favorecen la inmunofagocitosis.
- La expresión de receptores Fc γ R, inducida por la rhIL-1 β en las células 32D, no se acompaña de diferenciación morfológica, o de actividad citoquímica específica para linaje granulocito-neutrófilo o monocito macrófago.
- La rhIL-1 β inhibe la proliferación de las células 32D Cl3, sin afectar la viabilidad y sin inducir apoptosis.

BIBLIOGRAFIA

- Allen, T.D.** and Dexter, T.M. (1990). Marrow biology and stem cell. In Dexter, T.M., Garland, J.M., Testa, N.G. Colony-stimulating factors: Molecular and cellular biology. Marcel Dekker. New York. pp. 1-38.
- Aman, M.J., Keller, U., Derigs, G., Mohadatzabeh, M., Huber, C. and Peschel, C.** (1994). Regulation of cytokine expression by interferon- α in human bone marrow stromal cells: inhibition of hematopoietic growth factors and induction of interleukin-1 receptor antagonist. *Blood*, 84: 4142.
- Austin, T., Solar, G., Ziegler, F., Liem, L. and Matthews, W.** (1997). A role of the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. *Blood*. 89: 3624.
- Ayroldi, E., Blasi, E., Varesio, L. and Wiltout, R.** (1992). Inhibition of proliferation of retrovirus-immortalized macrophages by LPS and IFN-gamma: Possible autocrine down-regulation of cell growth by induction of IL-1 and TNF. *Biotherapy*, 4: 267.
- Basta, S., Knoetig, S., Spaguolo-Weaver, M., Allan G. and McCullough, K.C.** (1999). Modulation of monocytic cell activity and virus susceptibility during differentiation into macrophages. *J. Immunol.* 162: 3961.
- Beasley, D., Cohen, R.A. and Levinski, N.G.** (1989). Interleukin 1 inhibits contraction of vascular smooth muscle. *J. Clin. Invest.* 83: 331.
- Becker, S. and Daniel, E. G.** (1990). Antagonistic and additive effects of IL-4 and interferon- γ on human monocytes and macrophages : Effects on Fc receptors, HLA-D antigens and superoxide production. *Cel. Immunol.* 129: 351.
- Bendtsen, K.** (1994). Cytokines and natural regulators of cytokines. *Immunol. Lett.* 43: 111.
- Bigas, A., Martin, D.I. and Milner, L.A** (1998). Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. *Mol. Cell. Biol.* 18:2324.
- Boosalis, M.S., Ikuta, T., Pace, B.S., da Fonseca, S., White, G.L., Faller, D.V. and Perrine, S.P.** (1997). Abrogation of IL-3 requirements and stimulation of hematopoietic cell proliferation in vitro and in vivo by carboxylic acids. *Blood Cell. Mol. Dis.* 23:434.
- Bovolenta, C., Gasperini, S. and Cassatella, M.A.** (1996). Granulocyte colony-stimulating factor induces binding of STAT1 and STAT3 to the IFN gamma response region within the promoter of the Fc gamma RI/CD64 gene in human neutrophils. *FEBS Lett.* 386: 239-

Braakman, E., Van de Winkel, J.G.J., Van Krimpen, B.A., Jansze, M. and Bolhuis, R.L.H. (1993). CD 16 on human $\gamma\delta$ T lymphocytes : expression, function and especificity for mouse IgG-isotypes. *Cell Immunol.* 143: 97.

Britos-Bray, M., Sacchi, N. and Friedman, A.D. (1996). DNA-binding domain of AML1, expressed in t(8; 21) and t(3; 21) myeloid leukemias , inhibits PebP2/CBF DNA-binding but is not sufficient to transform 32D Cl3 myeloid cells. *Leukemia.* 10: 984.

Brooks, J. W. and Mizel, S. B. (1994). Interleukin-1 signal transduction. *Eur. Cyt. Net.* 5: 547.

Burova, L. Schalen, C. and Gladilina, M. (1997). Antigenic diversity of IgG Fc-receptors in *Streptococcus pyogenes*. *J. Dermatol.* 24: 730.

Carulli, G., Papineschi, F., Azzara, A. and Ambrogi, F. (1996). Alpha-2a-interferon administration and Fc gamma RIII expression on neutrophils from chronic myeloid leukemia. *Leukemia Res.* 20: 627.

Cassatella, M.A., Flynn, R.M., Aste, M., Bazzoni, F., Vicentini, F. and Trinchieri, G. (1990). Interferon gamma induces in human neutrophils and macrophages expression of the mRNA for the high affinity receptor for monomeric IgG (Fc γ RI or CD64). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170: 582.

Chaikin, E., Hermann, J. and Ehud, R. (1990). Protein Kinase C plays an inhibitory role in interleukin 3- and interleukin4- mediated Mast cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 265: 22109.

Clynes, R., Maiscs, J., Guinamard, R., Ono, M., Takai, T. and Ravetch, J. (1998). Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *J. Exp. Med.* 189: 179

Colotta, F., Re, F., Muzio, M., Bertini, R., Pllentarutti, N., Sironi, M., Giri, J.G., Dower, S.K., Sims, J.E. and Mantovani, A. (1993). Interleukin-1 type II receptor : a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 261: 4720.

Conrad, D.H. (1990). Fc ϵ RII/CD23: the low affinity receptor of IgE. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 623.

Cozzolino, F., Torcia, F. and Aldinucci, D. (1990). Interleukin-1 is an autocrine regulator of human endothelial cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 6487.

Crown, J., Jakubowski, A. and Gabrilove, J. (1995). Interleukin-1 \cdot biological effects in human hematopoiesis. In Martelsman, R. and Herrmann, F.: Hematopoietic growth factors in clinical applications. Second edition Marcel Dekker. New York. pp 189.

Curtsinger, J.M., Schmidt, C.S., Mondino, A., Lins, D.C., Kedi, R.M., Jenkins, M.K. and Mescher, M.F. (1999). Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4 super (+) and CD8 super (+) T cells. *J. Immunol.* 162: 3256.

Davidson, J., Kerr, A., Guy, K. and Rotondo, D. (1998). Prostaglandin and fatty acid modulation of *Escherichia coli* 0157 phagocytosis by human monocytic cells. *Immunol.* 94: 228.

De Andres, B., Mueller, A., Vaerbeek, S., Sandor, M. and Lynch, R. (1998). A regulatory role for Fcγ receptor CD16 and CD32 in the development of murine B cells. *Blood.* 92: 2823.

Dinarello, C.A., Ikejima, T., Warner, S., Orencoloe, S., Lonnenmann, G., Cannon, J. and Libby, P. (1987). Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cell in vitro. *J. Immunol.* 139: 1902.

Dinarello, C.A. (1989). Interleukin-1 and its related cytokines. In Sorg, C. (ed.): *Macrophage-derived cell regulatory factors. Cytokines. Vol.I Ed. Karger. Basseel, Switserland.* pp 105.

Dinarello, C.A. (1994). The biological properties of interleukin-1. *Eur. Cit. Net.* 5: 117.

Dinarello, C.A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 87: 2095.

Di Renzo, L., Zicari, A., Longo, A., Realacci, M., Naso, G., Pontieri, G. and Lipari, I. (1993). The hematopoietic progenitor 32D Cl3 (G) cells synthetize C3 molecules and acquire C3b acceptor sites upon differentiation or neoplastic transformation. *J. Immunol.* 151: 3737.

Ericson, S.G., Benoit, N.E., Mills, L.E. and Fangen, M.W. (1994). The effect of recombinant human interleukin-3 and recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on Fcγ receptor expression and antibody-dependent cellular cytotoxicity of hematopoietic progenitor cells during in vitro myeloid maturation. *Exp. Hem.* 22: 283

Ernst, L.K., Duchemin, A.M. and Anderson, C.L. (1993). Association of the high affinity receptor for IgG (FcγRI) with the γ subunit of the IgE receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 6023.

Estrov, Z. and Talpaz, M. (1997). Role of interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) in acute myelogenous leukemia cell proliferation and programmed cell death. *Leuk. Lymph.* 24: 379.

Fairchild, K.D., Hudson, R.G., Douglas, S.D., McKenzie, S.E. and Polin, R.A. (1996). Effect of gamma interferon on expression of Fc gamma receptors in monocytes of newborn infants and adults. *Clin. Diag. Lab Immunol* 3:464.

- Fibbe**, W. E. and Falkenburg, J. H. (1990). Regulation of hematopoiesis by interleukin-1. *Biotherapy*. 2: 325.
- Finkel**, M.S., Oddis, C., Jacob, T., Watkins, S., Hattler, B. and Simons, R. (1992). Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science*. 257: 387.
- Flesch**, B.K., Maass, W. and Neppert, J. (1998). NA1/NA2 antisera inhibit FcγRI but not FcγRII-mediated phagocytosis.
- Flores**, F. (1997). Expresión diferencial del ARNm para FcγRI y FcγRII inducida por factores de crecimiento hematopoyético en las líneas de macrófagos IC21 y de monocito-macrófagos P388 de ratón. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina-Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- Gaffney**, E.V., Koch, G., Tsai, S-C., Loucks, T. and Lingenfelter, S.E. (1988). Correlation between human cell growth response to interleukin 1 and receptor binding. *C. Res.* 48: 5455.
- Gagliardini**, V., Fernandez, P.A., Lee, R.K., Drexler, H.C., Rotello, R. J., Fishman, M.C. and Yuan, J. (1994). Prevention of vertebrate death by the *crmA* gene. *Sci.* 263: 826.
- Gericke**, H., Ericson, S.G., Pan, L., Millis, L., Guyre, P. and Ely, P. (1995). Mature polymorphonuclear leukocytes express high-affinity receptors for IgG (Fc gamma RI) after stimulation with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *J. Leuk. Biol.* 57: 455.
- Ghezzi**, P., Saccardo, B. and Villa, P. (1986). Role of interleukin-1 in the depression of liver drug metabolism by endotoxin. *Infect. Immunol.* 54: 837.
- Godin**, I., Gracia, J., Coutinho, A., Dieterien, F. and Marcos, M. (1993). Para-aortic aplanchnopleura from early mouse embryos contains B1 cell Progenitors. *Nature* 364: 67.
- Gordon**, M. and Barret, M. (1985). Bone marrow disorders the biologics basics to the clinical problems. London, England. Blackwell Scientific Publications. pp.20.
- Graziano**, R.F. and Fanger, M.W. (1987). FcγRI on monocytes and granulocytes are cytotoxic trigger molecules for tumor cells. *J. Immunol.* 139: 3536.
- Green**, J. M., Schreiber, A.D. and Brown, E. J. (1997). Role for a glycan phosphoinositol anchor in Fc gamma receptor synergy. *J. Cell. Biol.* 139: 1209.
- Greenberger**, J., Sakakeny, M., Humphries, R., Eaves, C. and Eckner, R. (1983) Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80:2931

- Greenberg, S.** and Silverstein, S.C. (1993). Phagocytosis. *Fundamental Immunology*. 3rd ed. Ed. Raven Press, New York.
- Greenblatt, M.** and Elias, L. (1992). The type B receptor for tumor necrosis factor- α mediates DNA fragmentation in HL-60 and U-937 cells and differentiation in HL-60 cells. *Blood* 80:1339-46.
- Griffin, J.D., Cannistra, S., Sullivan, R., Demetri, G., Ernst, T. and Kanakura, Y.** (1990). The biology of GM-CSF: regulation of production and interaction with its receptor. *Int. J. Cell. Cloning*. 8 (suppl. 1): 35.
- Gupta, A., Sharma, V., Vohra, H. and Ganguly, N.** (1999). Spontaneous apoptosis in peripheral blood mononuclear cells of leprosy patients: role of cytokines. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 24: 49.
- Harris, K.W., Hu, X.J., Schultz, S., Arcasoy, M.O. Forget, B.G. and Clare, N.** (1998). The distal cytoplasmic domain of the erythropoietin receptor induces granulocytic differentiation in 32D cells. *Blood*. 92:1219.
- Hayashi, M., Okabe, J. and Hozumi, M.** (1994). Flow-cytometric analysis of in vivo induction of differentiation of WEHI 3BD+ myelomonocytic leukemia cells by recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Exp Hematol* 22:393.
- Heijnen, I., Vugt, M., Fanger, N., Graziano, R., Wit, T., Hofhuis, F., Guyre, P., Capel, P., Verbeek, J. and Winkel, J.** (1996). Antigen targeting to myeloid-specific human Fc gamma RI/CD64 triggers enhanced antibody responses in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 97: 331.
- Hibbs, M.L., Hogarth, P.M. and McKenzie, I.F.C.** (1985). The mouse Ly 17 locus identifies a polymorphism of the Fc receptor. *Immunogenetics*. 22: 335.
- Hirose, K., Isogai, E., Mizugai, H., Miura, H. and Ueda, I.** (1996). Inductive effect of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae on differentiation of human monocytic tumor cell line U937. *Oral Microbiol. Immunol.* 11: 62.
- Hoffmeyer, F., Witte, K. and Schmidt, R.E.** (1997). The high-affinity Fc gamma RI on PMN: regulation of expression and signal transduction. *Immunol.* 92: 544.
- Hogarth, P.M., Witort, E., Hulett, M.D., Bonnerot, C., Even, J., Fridman, W.H. and McKenzie, I.F.C.** (1991) Structure of the mouse β Fc γ receptor II gene. *J. Immunol.* 146: 369.
- Hu, M.C. and Chien, S.L.** (1998). The cytoplasmic domain of stem cell antigen CD34 is essential for cytoadhesion signaling but not sufficient for proliferation signaling. *Blood* 91:1152.

Huges, N. (1991). Lecture notes on hematology. Fifth edition. Blackwell Scientific Publications. USA. pp.14

Hulett, M.D., Osman, N., McKenzie, I.F.C. and Hogarth, P.M. (1991). Chimeric Fc receptors identify functional domains of the murine FcγRI high affinity receptor for IgG. *J. Immunol.* 147: 1863.

Hulett, M.D. and Hogarth, P.M. (1994). Molecular basis of Fc receptor function. *Adv. Immunol.* 57: 2.

Humphries, R., Eaves, A. and Eaves, C. (1981). Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:3629-3633.

Hunter, S., Huang, M.M., Indik, Z.K. and Schreiber, A.D. (1993). FcγRIIA-mediated phagocytosis and receptor phosphorylation in cell deficient in the protein tyrosine kinase Src. *Exp. Hem.* 21: 1492.

Ihle, J., Bruce, A., Frederick, W., Koh, Y. and Olli, S. (1995). Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 369.

Indik, Z.K., Park, J.G., Hunter, S. and Schreiber, A.D. (1995). The molecular dissection of Fcγ Receptor mediated phagocytosis. *Blood.* 86: 4389.

Inoue, K., Tamaki, H., Ogawa, H., Oka, Y., Soma, T., Tatekawa, T., Oji, Y., Tsuboi, A., Kim, E.H., Kawakami, M., Akiyama, T., Kishimoto, T. and Sugiyama, H. (1998). Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 91:2969.

Isoda, H., Shinmoto, H., Kitamoto, D., Matsumara, M. and Nakahara. (1997). Differentiation of human promyelocytic cell line HL-60 by microbial extracellular glycolipids. *Lipids.* 32:263.

Jandl, J.H. (1991). *Blood: pathophysiology.* Blackwell Scientific Pub. USA.

Jazwicz, B; Solanilla, A; Grosset, C; Mahon, F-X; Dupouy, M; Pigeonnier-Lagarde, V; Belloc, F; Schweitzer, K; Reiffers, J; Ripoche, J. (1998). Endothelial cell support of hematopoiesis is differentially altered by IL-1 and glucocorticoids. *Leukemia.* 12: 1210.

Jovicic, G., Ivanovic, Z., Biljanovic-Paunovic, L., Bugarski, D., Stosic-Grujicic, S. and Milenkovic, P. (1996). The effect of IL-1 receptor antagonist on the proliferation of hematopoietic progenitor cells in regenerating bone marrow. *Leukemia.* 10: 564.

Kennedy S.M. and Borch R.F. (1999). IL-1β mediates diethyldithiocarbamate-induced granulocyte colony-stimulating factor production and hematopoiesis. *Exp. Hematol.* 27: 210.

- Kerst, J.M., Van de Winkel, J.G.J., Evans, A.H., Haas, M., Slaper-Cortenbach, I.C.M., de Wit, T.P.M., von dem Borne, A.E.G., van der Schoot, C.E. and Oers, R.H.J. (1993).** Granulocyte Colony-Stimulating Factor induces hFcγRI (CD64 antigen)-positive Neutrophils via an effect on myeloid precursor cells. *Blood*. 81: 1457.
- Kim, J.T., Schimming, A.W. and Kita, H. (1999).** Ligation of Fc gamma RII (CD32) pivotally regulates survival of human eosinophils. *J. Immunol.* 162. 4253.
- Kindler, V., Shields, J., Ayer, D. and Mazzei, G. (1991).** Growth regulation of the AML-193 leukemic cell line : evidence for autocrine production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and inhibition of GM-CSF-dependent cell proliferation by interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNFα). *Int. J. Canc.* 47: 450.
- Kipps, T.J., Parham, P., Punt, J. and Herzenberg, L.A. (1985).** Importance of immunoglobulin isotype in human antibody dependent, cell-mediated cytotoxicity directed by murine monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 161:1.
- Klein, G. (1995).** The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia.* 51: 914.
- Koenderman, L., Hermans, S.W.G., Capel, P.J.A. and van de Winkel, J.G.J. (1993).** Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor induces sequential activation and deactivation of binding via a low-affinity IgG Fc receptor, hFcγRII, on human eosinophils. *Blood*. 81: 2413.
- Kohase, M., May, L., Tamm, I., Vilcek, J. and Sehgal, P. (1987).** A cytokine network in human diploid fibroblast: interaction of β-interferons, tumor necrosis factor, platelet-derived growth factor and interleukin-1. *Mol. Cell. Biol.* 7: 273.
- Kovacs, E.J., Oppenheim, J., Carter, D. and Young, H. (1987).** Enhanced interleukin-1 production by human monocyte cell lines following treatment with 5-azacytidine. *J. Leuk. Biol.* 41: 40.
- Koyasu, S., Yodoy, J., Nikaïdo, T., Tagaya, Y., Taniguchi, Y., Honjo, T. and Yahara, I. (1996).** Expression of interleukin 2 receptors on interleukin 3-dependent cell lines. *J. Immunol.* 138: 478.
- Krane, S.M., Conca, W., Stephenson, M., Amento, E. and Goldring, M. (1990).** Mechanism of matrix degradation in rheumatoid arthritis. *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA.* 580: 340.
- Kreider, B.L., Phillips, P.D., Prystowsky, M.B., Shirsat, N., Pierce, J.H., Tushinski, R. and Rovera, G. (1990).** Induction of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) receptor by granulocyte CSF increases the differentiative options of a murine hematopoietic progenitor cell. *Mol. Cell. Biol.* 10: 4846.

- Lah, M., Quelch, K., Deacon, N.J., McKenzie, I.F.C. and Hogarth, P.M. (1990).** Identification of the mouse β Fc γ RII polymorphism by direct sequencing of amplified genomic DNA. *Immunogenetics*. 31:202.
- Lanier, L.L., Ruitenberg, J.J. and Phillips J.H. (1988).** Functional and biochemical analysis of CD 16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J. Immunol.* 141: 3478.
- Lantz, C.S. and Huff, T. (1995).** Murine Kit⁺ lineage-bone marrow progenitors express Fc gamma-RII but do not express Fc epsilon-RI until mast cell granule formation. *J. Immunol.* 154: 355.
- Larsen, C.M., Wadt, KAW., Juhl, L.F., Andersen, H.U., Karlsen, A.E., Su, M.S., Seedorf, K. Shapiro, L., Dinarello, C.A. and Mandrup-Poulsen, T. (1998).** Interleukin-1 beta - induced rat pancreatic islet nitric oxide synthesis requires both the p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 273: 15294.
- Libby, P., Warner, S. and Friedman, G. (1988).** Interleukin-1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanooids. *J. Clin. Invest.* 81: 487.
- Lin, J.D., Chao, T.C., Weng, H.F. and Lin, K.D. (1998).** The roles of cytokines and retinoic acid in the regulation of thyroid cancer cell growth. *Cytokine.* 10: 536.
- Lisi, P.J., Chu, C. and Koch, G. (1987).** Development and use of a radioimmunoassay for human interleukin-1-beta. *Lymp. Res.* 6: 229.
- Lobell, R.B., Arm, J., Raizman, M., Austen, K. and Katz, H. (1993).** Intracellular degradation of Fc γ RIII in mouse bone marrow culture-derived progenitor mast cells prevents its surface expression and associated function. *J. Biol. Chem.* 268: 1207.
- Lobell, R.B., Austen, K.F. and Katz, H.R. (1994).** Fc γ R-mediated endocytosis and expression of cell surface Fc γ RIIb1 and Fc γ RIIb2 by mouse bone marrow culture-derived progenitor mast cells. *J.Immunol.* 152: 811.
- Looney, R.J., Ryan, D.H., Takahashi, K., Fleit, H.B., Cohen, H.J., Abraham, G.N. and Anderson, C.L. (1986).** Identification a second class of IgG receptors on human neutrophils: A 40 kD molecule also found on eosinophils. *J. Exp. Med.* 163: 826.
- Lovett, D., Kozan, B., Hadam, M., Resch, K. and Gemsa, D. (1986).** Macrophage cytotoxicity: interleukin-1 is a mediator of tumor cytostasis. *J. Immunol.* 136: 340.
- Lowenthal, J.W., Castla, B.E., Christiansen, J., Schreurs, J., Rennick, D., Arai, N., Hoy, P., Takebe, Y and Howard, M. (1988).** Expression of high affinity receptors for murine interleukin 4 (BSF-1) on hematopoietic and non-hematopoietic cells. *J Immunol.* 140: 456.

- Lowry, P.A.** and Quesenberry, P.J. (1992). Overview of hematopoiesis. in Symann, M. Quesenberry, P.J., Morstyn, G.(ed): Hematopoietic growth factors: from the basic to clinical application. Gardnier-Caldwell. United Kingdom. pp 9-15.
- Maier, J.A.M.,** Voulalas, P., Roeder, D. and Maciag, T. (1990). Extension of the life span of human endothelial cells by an interleukin-1 α antisense oligomer. *Science*. 249: 1570.
- Malbec, O.,** Fridman, W.H. and Daeeron, M. (1999). Negative regulation of c-kit-mediated cell proliferation by Fc gamma RIIB. *J. Immunol.* 162. 4424.
- McKenzie, S.E.** and Schreiber, A.D. (1994). Biological advances and clinical applications of Fc receptors for IgG. *Curr. Opin. Hematol.* 1: 45.
- Mellman, I.,** Koch, T., Healy, G., Hunziker, W., Lewis, V., Plutner, H., Miettinen, H., Vaux, D., Moore, K. and Stuart, S. (1988). Structure and function of Fc receptors on macrophages and lymphocytes. *J. Cell. Sci. Suppl.* 9:45.
- Metcalf, B.** (1985). Multi-CSF-depend clony formation by cells of a murine hematopoietic cell line : specificity and action of multi-CSF. *Blood.* 65: 357.
- Migliaccio, G.,** Miglaccio, A., Kreider, B., Rovera, G. and Adamson, J. (1989). Selection of lineage-restricted cell lines immortalized at differentiation from the murine cell line 32D. *J. Cell. Biol.* 109:833.
- Miller, K.L.,** Duchemin, A.M. and Anderson, C.L. (1996). A novel role for the Fc receptor gamma subunit: Enhancement of Fc gamma R ligand affinity. *J. Exp. Med.* 183: 2227.
- Minami, M.,** Inoue, M., Wei, S., Matsumoto, M., Kishimoto, T. and Akira, S. (1996). STAT3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 3963.
- Miura, M.,** Zhu, H., Rotello, R., Hartweg, E.A. and Yuan, J. (1993). Induction of apoptosis in fibroblast by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell.* 75: 653.
- Moingeon, P.,** Rodenwald, H.R., McConkey, D., Mildonian, A., Awad, K. and Reinherz, E.L. (1993). Generation of natural Killer from both Fc gamma RII/III+ and Fc gamma RII/III- murine fetal liver progenitors. *Blood.* 82: 1453.
- Moldawer, L.L.,** Anderson, C., Gelin, J. and Lundholm, K. (1988). Regulation of food intake and hepatic protein synthesis by recombinant derived cytokines. *Am. J. Physiol.* 254: G450.
- Moldovan, I.** (1999). Regulation of production of soluble Fc gamma receptors type III in normal and pathological conditions. *Immunol. Lett.* 68: 125.

Morrison, S., Uchida, N. and Weissman, I. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:35-71.

Mostov, K.E. (1994). Transepithelial transport of immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 63.

Moura, E., Verheul, A. and Marx, J. (1997). Evaluation of the role of Fc gamma and complement receptors in the decreased phagocytosis of hereditary haemochromatosis patients. *Scand. J. Immunol.* 46: 339.

Muegge, K., Vila, M., Gusella, G., Musso, T., Herrlich, P., Stein, B. and Durum, S. (1993). IL-1 induction of the c-jun promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 7054.

Muta, T., Kurosaki, T., Misulovin, Z., Sanchez, M., Nussenzweig, M.C. and Ravetch, J.V. (1994). A 13 aminoacid motif in the cytoplasmic domain of FcγRIIb modulates B-cell receptor signalling. *Nature.* 368: 70.

Ogawa, M. (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood.* 81: 2844.

Ogawa, M. and Matsunaga, T. (1999). Humoral regulation of hematopoietic stem cells. *Annu. Acad. Sci.* 872: 17.

Olweus, J., Lund-Johansen, F., and Terstappen, L.W.M.M. (1995). CD64/FcγRI is a granulocyte-monocytic lineage marker on CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 85: 2402.

O'Neill, L.A., Bird, T.A., Geraing, J. and Saklatava, J. (1990). Interleukin-1 signal transduction. Increased GTP binding and hydrolysis in membranes of a murine thymoma line (EL4). *J. Biol. Chem.* 265: 3146.

Onozaki, K., Tamatani, T., Hashimoto, T. and Matsushima, K. (1987). Growth inhibition and augmentation of mouse myeloid leukemic cell line differentiation by interleukin 1. *Canc. Res.* 47: 2397.

Onozaki, K., Urawa, H., Tamatani, T., Iwamura, Y., Hashimoto, T., Baba, T., Suzuki, H., Yamada, M., Yamamoto, S., Oppenheim, J. and Matsushima, K. (1988). Synergistic interaction of interleukin-1, interferon-β and tumor necrosis factor in terminally differentiating a mouse myeloid leukemic cell line (M1). *J. Immunol.* 140: 112.

Orikasa, M., Kawase, T. and Suzuki, A. (1993). Induction of macrophagic and granulocytic differentiation of murine bone marrow progenitor cells by 1,25-dihydroxyvitamin D sub(3). *Calcif. Tiss. Int.* 53: 193.

Orkin, S.H. (1995). Transcription factors and hematopoietic development. *J. Biol. Chem.* 270: 4955.

- Orlic, D.** and Bodine, D. (1994). What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): Will the real PHSC please stand up!. *Blood* 84:2991-2994.
- Osman, N.,** Kozak, C.A., McKenzie, I.F.C. and Hogarth, P.M. (1992). Structure and mapping of the gene encoding mouse high affinity FcγRI and chromosomal location of the human FcγRI gene. *J. Immunol.* 148: 1570.
- Pearse, R.N.,** Kawabe, T., Bolland, S., Guinamard, R., Kurosaki, T. and Ravetch, J.V. (1999). SHIP recruitment attenuates Fc gamma RIIB- induced B cell apoptosis. *Immunity.* 10: 753.
- Perussia, B.** and Ravetch, J.V. (1991). FcγRIII (CD16) on macrophages is a functional product of the FcγRIII-2 gene. *Eur. J. Immunol.* 21: 425.
- Perussia, B.,** Dayton, E.T., Lazarus, R., Fanning, V. and Trinchieri, G. (1983). Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells. *J. Exp. Med.* 158: 1092.
- Petzeltbauer, P.** and Groger, M. (1997). Cutaneous immune complex vasculitis: the role of Fc gamma receptors in precipitating the disease. *J. Dermatol.* 24: 730.
- Pirhonen, J.,** Sareneva, T., Kurimoto, M., Julkunen, T. and Matikainen, S. (1999). Virus infection activates IL-1 beta and IL-18 production in human macrophages by a caspase-1-dependent pathway. *J. Immunol.* 162: 7322.
- Ravetch, J.V.** and Kinet, J.P. (1991). Fc Receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 9: 457
- Ravetch, J.V.** 1994. Fc receptors: rubor redux. *Cell.* 78: 553
- Reep, R.,** Sandler, V., Gramatzki, M., Iro, H., Kalden, J.R. and Platzner, E. (1991). Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (FcγRI,CD64) after in vivo application of recombinant human Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Blood.* 78: 885.
- Rodel, J.** and Link, D. (1996). Suppression of apoptosis during cytokine deprivation of 32D cells is not sufficient to induce complete granulocytic differentiation. *Blood.* 87:858.
- Ross, G.D.** and Newman, S.L. (1984) Regulation of macrophage functions by complement, complement receptors, and IgG-Fc receptors. From: The reticuloendothelial system. A comprehensive treatise. Vol. 6. Immunology. Bellanti, J.A. and Herscovitz, H.B eds. Plenum Press. New York. USA.
- Ruhl, S.** and Pluznik, D.H. (1993). Dissociation of early and late markers of murine myeloid differentiation by interferon-gamma and interleukin-6. *J. Cell Physiol.* 155:130.

- Sambrano**, G. R., Terpstra, V. and Steinberg, D. (1997). Independent mechanism for macrophage phagocytosis of damaged erythrocytes. Evidence of receptor cooperativity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 3442.
- Sanchez**, X., Suetomi, K., Cousins-Hodges, B., Horton, J.K. and Navarro, J. (1998). CXC chemokines suppress proliferation of myeloid progenitor cells by activation of the CXC chemokine receptor 2. *J. Immunol.* 160:906.
- Santiago**, O.E., Mendoza, J.F., Corona, M.T., Lopez, R., Sanchez, L., Mora, M., Flores, F., Valencia, E. and Weiss-Steider B. (1993). Induction of Fc receptors on murine macrophages and leukemic cells by interleukin-1 β . *Eur. Cytokine Network.* 4: 223.
- Santiago**, O.E. (1996) Inducción a la expresión de receptores Fc por la interleucina-1 en células mieloides normales y leucémicas de ratón y humano. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias- Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- Sarmay**, G., Koncz, G., Pecht, Y. and Gergely, J. (1999). Cooperation between SHP-2 phosphatidyl inositol 3-kinase and phosphoinositol 5-phosphatase in the Fc gamma RIIB mediated B cell regulation. *Immunol. Lett.* 68: 25.
- Sears**, D.W., Osman, N., Tate, B., McKenzie, I.F.C. and Hogarth, P.M. (1990). Molecular cloning and expression of the mouse high affinity Fc receptor for IgG. *J. Immunol.* 144: 371.
- Shido**, K., Ahmad, G., Hsu, L. and Kamiyama, M. (1995). Human platelet Fc receptors: binding kinetics of Fc derivates to the receptors. *J. Clin. Lab. Immunol.* 46. 25.
- Shieh**, J.H., Gordon, M.S., Peterson, R.H., Jakwbowski, A., Gabrilove, J. and More, M.A. (1990). Modulation of cytokine receptor and superoxide production in neutrophils treated with IL-1 in vitro and in vivo. *Blood.* 76 (supp): 165.
- Sivo**, J., Politis, D.A. and Voguel, S.N. (1993). Differential effects of interferon- gamma and glucocorticoids on Fc gamma R gene expression in murine macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 54: 451.
- Snoeck**, H.W., Van Bockstaele, D.R., Nys, G., Lenjou, M., Lardon, F., Haenen, L., Rodrigus, I., Peetermans, M.E. and Berneman, Z.N. (1994). Interferon gamma selectively inhibits very primitive CD34 super(2+)CD38 super(-) and not more mature CD34 super(+)CD38 super(+) human hematopoietic progenitor cells. *J. Exp.Med.* 180: 1177.
- Sylvestre**, D.L. and Ravetch, J.V. (1994). Fc receptors initiate the Arthus reaction: redefining the inflammatory cascade. *Science.* 265: 1095.
- Takai**, T., Ono, M., Iikida, M., Ohmori, H. and Ravetch, J.V. (1996). Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc γ RII-deficient mice. *Nature.* 379: 346.

- Tanaka S, Saito K. and Reed JC. (1993).** Structure-function analysis of the bcl-2 oncoprotein, addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2 protein restores function as a regulator of cell survival. *J. Biol. Chem.* 268: 10920.
- Tartour, E., De la Salle, H., De la Salle, C., Teillaud, A., Camoin, L., Galinha, A., Latour, S., Hanan, D., Fridman, W.F. and Sautes, C. (1993).** Identification, in mouse macrophages and in serum, of a soluble receptor for the Fc portion of IgG (FcγR) encoded by an alternative spliced transcript of the FcγRII gene. *Int. Immunol.* 5: 859.
- Tewari, A., Buhles, W. and Starnes, H. (1990).** Preliminary report: effects of interleukin-1 on platelet counts. *Lancet.* 336: 712.
- Toles, J., Chui, D., Belbeck, L., Starr, E. and Barker, J. (1989).** Hemopoietic stem cells in murine embryonic yolk sac and peripheral blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:7456.
- Toyabe, S., Kuwano, Y., Takeda, K., Uchiyama, M. and Abo, T. (1997).** IgA nephropathy-specific expression of the iGA Fc receptors (CD89) on blood phagocytic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 110: 226.
- Tsao, C.J., Tojo, A., Fukamachi, H., Kitamura, T., Saito, T., Urabe, A. and Takaku, F. (1988).** Expression of the functional erythropoietin receptors on interleukin 3-depend murine cell lines. *J. Immunol.* 140: 89.
- Uciechowski, P., Schwarz, M., Gessner, J.E., Schmidt, R.E., Resch, K. and Radeke, H. (1998).** IFN-gamma induces the high-affinity Fc receptor Y for IgG (CD64) on human glomerular mesangial cells. *Eur. J. Immunol.* 28: 2928.
- Ulich, T.R., Del Castillo, J., Keis, M., Granger, G.A. and Ni, R. (1987).** Kinetics and mechanisms of recombinant human interleukin-1 and tumor necrosis factor-α induces changed in circulating numbers in neutrophils and lymphocytes. *J. Immunol.* 139: 3406.
- Unkeless, J.C. (1979).** Characterization of a monoclonal antibody direct against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J. Exp. Med.* 150: 580.
- Unkeless, J.C., Scigliano, E. and Freedman, V.H. (1988).** Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu. Rev. Immunol.* 6: 251.
- Unkeless, G.G. (1989).** Function and heterogeneity of human Fc receptors for immunoglobulin G. *J. Clin. Invest.* 83: 355
- Valtieri, M., Tweardy, D., Caracciolo, D., Jhonson, K., Mavilio, F., Altman, S., Santoli, D. and Rovera, G. (1987).** Cytokine-dependent granulocytic differentiation. *J Immunol* 11:3829.
- Van de Winkel, J.G.J. and Capel, J A. (1993).** Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol. Today* 14: 215.

- Van Den Herik-Oudijk, I.E.,** Westerdal, N.A.C., Enriquez, N.V., Capel, P.J.A. and Van de Winkel, J.G.J. (1994). Functional analysis of human FcγRII (CD32) isoforms expressed in B lymphocytes. *J. Immunol.* 152: 574.
- Van Le, L.,** Oh, Sung-Tack., Anners, J.A., Rinehart, C.A. and Halme, J. (1992). Interleukin-1 inhibits growth of normal human endometrial stromal cells. *Obstet. Gynecol.* 80: 405.
- Vaughn, D.E.,** Milburn, C.M., Penny, D.M., Martin, W.L. Johnson, J.L. and Bjorman, P.J. (1997). Identification of critical IgG binding epitopes on the neonatal Fc receptor.
- Vogel, S.N. and** Rosenstreich, D.K. (1979). Defective Fc receptor-mediated phagocytosis in C3H/HeJ macrophages. I. Correction by lymphokine-induced stimulation. *J. Immunol.* 123: 2842.
- Voice, J.K. and** Lanchman, P.J. (1997). Neutrophil Fc gamma and complement receptors involved in binding soluble IgG immune complex and in specific granule release induced by soluble IgG immune complexes. *Eur. J. Immunol.* 27: 2514.
- Wallace, P.K.,** Howell, A.L. and Fanger, M.W. (1994). Role of Fc receptors in cancer and infectious disease. *J. Leuk. Biol.* 55: 816.
- Wang, A.V.T.,** Scholl, P.R. and Geha, R.S. (1994). Physical and functional association of the high affinity immunoglobulin G receptor (FcγRI) with the kinases Hck and Lyn. *J. Exp. Med.* 180: 1165.
- Watari, K.,** Mayani, H., Lec, F., Dragowska, W., Lansdorp, P.M. and Schrader, J.W. (1996). Production of interleukin 1 beta by human hematopoietic progenitor cells. *J. Clin. Invest.* 97: 1666.
- Warren, H.S. and** Kinnear, B.F. (1999). Quantitative analysis of the effect of CD16 ligation on human NK cell proliferation. *J. Immunol.* 162: 735.
- Webb, A. C.,** Collins, K., Auron, P., Eddy, R., Nakay, H., Byers, M., Haley, L., Henry, W. and Shows, T. (1986). Interleukin-1 gene (IL-1) assigned the long arm of human chromosome 2. *Lymph. Res.* 5: 77.
- Weinshank, R.L.,** Luster, A. D. and Ravetch, J.V. (1988). Function and regulation of a murine macrophage specific IgG Fc receptor, FcγRα. *J. Exp. Med.* 167:1909.
- Whetton, A. and** Spooncer, E. (1998). Role of cytokines and extracellular matrix in the regulation of haematopoietic stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 721
- William, R ,** Watson, G., Rotstein, O.D., Parodo, J., Bitar, R. and Marshall, J. (1998). The IL-1 beta-Converting Enzyme (Caspase-1) inhibits apoptosis of inflammatory Neutrophils through activation of IL-1 beta. *J. Immunol.* 161: 957.

Wilson, K. C. and Flinbloom, D.S. (1992). Interferon gamma rapidly induces in human monocytes a DNA-binding factor that recognizes the gamma response region within the promoter of the gene for the high-affinity Fc gamma receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 11964.

Wintrobe, M.M., Lee, C.R., Boggs, D.R., Bithel, T.C., Athens, J.W. and Foerster, J. (1975). *Clinical Hematology*. Seventh edition. Lea and Febiger, Philadelphia. pp. 59

Wu, Z., Markovic, B., Chesterman, C. and Chong, B. (1996). Characterization of IgG Fc receptors on CD34 antigen-expressing cell lines (KG-1 and KG-1a). *Immunol. Cell. Biol.* 74: 57.

Xu, D., Yoder, M., Sutton, J. and Hromas, R. (1998). Forced expression of Genesis, a winged helix transcriptional repressor isolated from embryonic stem cells, blocks granulocytic differentiation of 32D myeloid cells. *Leukemia* 12:207.

Yonemura, Y., Ku, Hsun., Hirayama, F., Souza, L.M. and Ogawa, M. (1996). Interleukin 3 or interleukin 1 abrogates the reconstituting ability of hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 4040.

Yoshikawa, H., Sakihama, T., Nakajima, Y. and Tasaka, K. (1996). Costimulation of fibronectin receptor promotes FcγR-mediated rescue of IL-3-dependent bone marrow-derived cells from apoptosis. *J. Immunol.* 156: 1832.

Zentella, A., Weis, F.M.B., Ralph, D.A., Lahio, M. and Massague, J. (1991). Early responses to TGF-β in cells lacking growth suppressive RB function. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4952.

Zucker, D., Greaves, M., Grossi, C. and Marmont, A. (1988). *Atlas of blood cells. Function and pathology*. 2da. Edición. Arti Grafiche Salea, Italy. Vol 1, 761 pp.

APENDICE

Apéndice A. Soluciones

- 1. Solución stock de Giemsa:** Disolver 0.5 gr. de Giemsa (Sigma, USA) en 50 ml de metanol. Cubrir de la luz y guardar a temperatura ambiente. Usar 24 horas después.
- 2. Solución de Giemsa para teñir células:** Diluir 1: 10 la solución stock.
- 3. Solución amortiguadora de fosfatos (PBS):** Disolver 8 gr. de cloruro de sodio, 2.16 gr. de fosfato de sodio monobásico, 0.2 gr. de fosfato de potasio y 0.2 gr. de cloruro de calcio en 800 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.2 y aforar a 1 litro. Esterilizar en autoclave a 20 libras durante 20 minutos. Guardar a 4°C.
- 4. Solución de Alsever:** Disolver 20.5 gr. de Dextrosa, 8 gr. de citrato de sodio dihidratado, 0.55 gr. de ácido cítrico monohidratado y 4.2 gr. de cloruro de sodio en 900 ml de agua. Ajustar el pH a 6.1 y aforar a 1 litro. Se esteriliza en autoclave a 20 lb durante 20 minutos. Guardar a 4°C.
- 5. Buffer de lisis para eritrocitos:** Disolver 8.29 gr. de cloruro de amonio, 0.1 gr. de carbonato monobásico de potasio y 37.2 mg. de EDTA disódico en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.2-7.4 con HCl 1N. Llevar a 1 litro y filtrar a través de una membrana de 0.22 μm . Guardar a 4°C.
- 6. Solución de PBS al 1% de BSA desionizada.** Pesar 35 gr. de albúmina de bovino (BSA) y agregar 100 ml de PBS. Dejar toda la noche a 4° C. Adicionar 10 ml de resina de intercambio iónico. Dejar toda la noche a 4° C. Ajustar el pH a 7.3. Filtrar en 0.45 μm . Filtrar en 0.22 μm . La solución Stock que se obtiene es al 35%, para usarla se diluye hasta el 1% en PBS estéril. Guardar a 4° C.

Apéndice B. Análisis citoquímico: Tinción cloroacetato esterasa para granulocito-neutrófilo

Reactivos.

1.- Naftol- AS-D Cloroacetato

Disolver 5 mg. en 2.5 ml de N-N, dimetil formamida. Estable por dos meses, 4-6^o C.

2.-Solución fijadora

Disolver en agua destilada(30 ml)

Na₂HPO₄(20 mg)

KH₂PO₄ (100 mg)

Acetona (45 ml)

Formaldeído(25 ml)

Ajustar ph a 6.6. Estable por más de dos meses, 4-6^o C.

3.-Solución de fuccina nueva

Disolver fuccina (1gr.) en HCL 2N (25 ml) en baño maría. Filtrar cuando alcance la temperatura ambiente. Estable por dos meses a temperatura ambiente.

4.- Solución de nitrito de sodio al 4 %.

Disolver nitrito de sodio (1gr.) en agua destilada (25 ml). Estable 7 días en refrigeración a 4°C.

5.- Solución de fosfatos pH 7.73

Disolver Na₂HPO₄ (0.852 gr.) y KH₂PO₄ (0.09gr.), en 100 ml de agua destilada.

6.- Hematoxilina de Meyer (Sigma USA).

7.- Suero fisiológico

NaCl al 0.9%

Procedimiento.

***Como control positivo se usaron granulocitos de médula ósea de ratón CD-1

1.- Fijar los extendidos durante 30 segundos.

2.- Lavar con suero fisiológico.

3.- Incubar durante 30 min. en la siguiente solución:

a) 50 µL de la solución de nitrito de sodio + 50 ml de la solución de fuccina nueva

Mezclar las dos soluciones durante un minuto, adicionar 9.5 ml de la solución de fosfatos PH 7.73

4.- Agregar 0.5 ml de la solución de naftol AS-D Cloroacetato.

5.-Lavar con agua destilada.

3.- Teñir 10-30 min. con hematoxilina de Meyer.

Lavar abundantemente con agua destilada.

En las células positivas se observan granulos rojos brillantes en el citoplasma.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Apéndice C. Análisis citoquímico: Tinción α -naftil acetato esterasa para monocito-macrófago.

Reactivos.

1.- Alfa-Naftil Acetato

2.-Solución fijadora

Disolver acetato de sodio (60 mg) en acetona (60 ml), adicionar agua destilada (40 ml) y ácido acético (70 μ l). Estable por dos meses, 4-6^o C.

3.-Solución de pararosanilina

Disolver pararosanilina (1gr.) en HCL 2N (25 ml) en baño maria. Filtrar cuando esté a temperatura ambiente. Estable por dos meses, 4-6^o C.

4.-Solución de nitrito de sodio al 4 %.

Disolver nitrito de sodio (1gr.) en agua destilada (25 ml). Estable 7 días en refrigeración a 4^oC.

5.- Solución de fosfatos 0.2 M pH 7.0-7.1

a) 11.9 gr. de fosfato de sodio ácido monohidratado (NaH_2PO_4) en 500 ml de Agua destilada.

b) 14.196 gr. de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) en 500 ml de agua destilada Mezclar 250 ml de la solución 'b' con 130 ml de la solución 'a' y ajustar el pH a 7.0-7.1

6.- Hematoxilina de Meyer (Sigma USA)

7.- Suero fisiológico

NaCl al 0,9%

Procedimiento.

***Como control positivo se usó la línea celular leucémica de tipo monocito-macrófago P388

1.- Fijar los extendidos durante un minuto.

2.- Lavar con suero fisiológico.

3.- Incubar durante 60 min. en la siguiente solución:

a) 50 μ l de la solución de nitrito de sodio + 50 μ l de la solución de pararosanilina.

Mezclar las dos soluciones durante un minuto, adicionar 5 ml de la solución de fosfatos 0.2 M pH 7.0 a 7.1.

b) Diluir 10 mg de α -naftil acetato en 0.2-0.3 ml de acetona después agregar agitando 20 ml de la solución de fosfatos 0.2 M.

c) Mezclar las dos soluciones y filtrar.

4.- Lavar con agua destilada.

5.- Teñir 10-30 min, con hematoxilina de Meyer.

Lavar abundantemente con agua destilada y dejar secar.

En las células positivas se observa un precipitado difuso color marrón en el citoplasma.