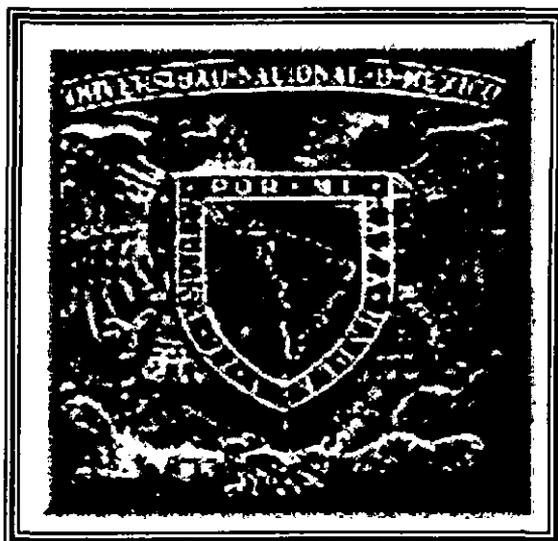


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Investigaciones Biomédicas



290606

**TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DURANTE LA FAGOCITOSIS
MEDIADA POR RECEPTORES Fc γ**

*RECLUTAMIENTO DE PI 3-K Y ERK PARA FAGOCITOSIS
DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA

ERICK GARCÍA GARCÍA

MEXICO, D.F. MARZO 2001



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.

Este trabajo, titulado
“Transducción de señales durante la fagocitosis por receptores Fcγ”
fue dirigido por el *Dr. Carlos Rosales Ledezma*
y realizado en el departamento de Inmunología
en Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM
Este trabajo fué apoyado por el proyecto
IN 201797 de DGAPA-UNAM
y el proyecto 31088-M de Conacyt, México
El jurado asignado para el examen está compuesto por
Presidente. *Dr. Edmundo Lamoyi Velázquez*
Secretario. *Dr. Fernando López Casillas*
Vocal. *Dr. Carlos Rosales Ledezma*
Dr. Eduardo García Zepeda
Dr. Yvone Rossenstein Azuoulay

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco al *Dr. Carlos Rosales Ledezma* por su apoyo, por la gran cantidad de tiempo que ha dedicado pacientemente a mi formación académica, por su amistad, por compartir conmigo su maravillosa visión de la ciencia y por enseñarme que antes que

cualquier cosa hacer ciencia es divertido.

Al *Dr. Fernando López Casillas* por haber contribuido en forma decisiva a mi formación académica, por sus consejos, sus críticas.

A la *Dra. Guillermina Yankelevich* y a la *Dra. Julieta Rubio* por su maravillosa guía en la primera (y quizá más importante) etapa de mi formación académica.

A la *Dra. Yvone Rossenstein*, al *Dr. Edmundo Lamoyi* y al *Dr. Eduardo Garcia* por sus invaluable críticas y sus comentarios sobre este trabajo.

A la *Dra. Margarita De Leonardo* por el largo viaje que hicimos juntos para rediseñar mi mundo.

A *Pepe* y *Valentín* por compartir conmigo las magias de la Biología Molecular y del correcto manejo de los bichos.

A *Gina* por todo su cariño.

A *Palola (tan bonita)* por su amistad.

A *Anita* por que si.

A mis amiguitos *Maru* y *Etor*, por la lata que dan.

A M. een IBB *Nancy ora Pérez* por el apoyo técnico.

A todas las niñas (especialmente a las pelirrojas) por ponerle un poquito de color al mundo.

*Este trabajo está dedicado a mis
Padres. Gracias por su amor y toda
su paciencia.*

I. RESUMEN.

El proceso de fagocitosis es una función celular de gran importancia dentro del sistema inmunológico. Actualmente existe gran interés en definir las moléculas que regulan este proceso en los diferentes fagocitos del sistema inmunológico (1-4). Utilizando inhibidores farmacológicos se evaluó el papel de las enzimas fosfatidilinositol 3-cinasa (PI 3-K) y Cinasa activada por mitógenos (ERK), en la fagocitosis mediada por receptores Fcγ (FcγRs) en monocitos. El tratamiento de monocitos de la línea celular humana THP-1 con wortmanina, inhibidor específico de PI 3-K, o con PD98059, inhibidor específico de ERK, no tuvo efecto sobre la fagocitosis mediada por FcγRs. El tratamiento de monocitos THP-1 con ácido retinóico y con interferón gamma (IFN-γ) indujo su diferenciación a células con fenotipo de macrófagos. El tratamiento de los macrófagos derivados de monocitos con wortmanina bloqueó la respuesta fagocítica mediada por FcγRs sólo después de 48 horas de diferenciación con IFN-γ. El tratamiento de macrófagos derivados de monocitos con PD98059 bloqueó la respuesta de fagocitosis mediada por FcγRs a las 24 y a las 48 horas de diferenciación con IFN-γ. Tanto wortmanina como PD98059 bloquearon la respuesta de fagocitosis mediada por FcγRs en neutrófilos humanos. Los niveles de fagocitosis basal (i.e. fagocitosis no estimulada) fueron muy similares en los neutrófilos, los macrófagos y los monocitos. Sin embargo, cuando las células se estimularon con ésteres de fórbol, los neutrófilos y los macrófagos presentaron niveles de fagocitosis mayores que el nivel de fagocitosis alcanzado por los monocitos estimulados. Estos resultados indican que el proceso de fagocitosis por FcγRs en monocitos es independiente de las enzimas PI 3-K y ERK. Sin embargo, durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos, PI 3-

K y ERK se reclutan a la maquinaria fagocítica en forma ordenada; primero se recluta ERK y posteriormente PI 3-K. Estos resultados también sugieren que la utilización de PI 3-K y ERK por fagocitos profesionales (i.e. neutrófilos y macrófagos) para fagocitosis por FcγRs permite una respuesta fagocítica más eficiente.

En este trabajo se describe además un método para medir fagocitosis basado en la citometría de flujo (CMF). Este método permite medir fagocitosis en dos tipos de fagocitos (neutrófilos y monocitos) de forma simple. Esta técnica puede ser utilizada en estudios de transducción de señales, pues permite evaluar cambios en los niveles de fagocitosis, en función del estado de activación de los fagocitos, o bien cambios inducidos por la inhibición de enzimas involucradas en los eventos de señalización que regulan la respuesta fagocítica en neutrófilos o en monocitos.

II. INTRODUCCIÓN.

II.1 El proceso de fagocitosis.

El término “fagocitosis” se aplica por lo general al proceso de ingestión de partículas con un diámetro mayor de 1 μm , por células especializadas (5). Los mecanismos de internalización de partículas de este tamaño difieren claramente de los mecanismos celulares utilizados para la endocitosis de material soluble (5). En el contexto del sistema inmunológico la fagocitosis es una respuesta celular por medio de la cual se reconocen, se internalizan y se destruyen microorganismos, complejos inmunes y restos celulares (6).

Durante la década de 1880 Elie Metchnikoff publicó varios trabajos reportando la existencia de células con la capacidad de ingerir y digerir una gran variedad de partículas, en diversos organismos. Metchnikoff llamó a estas células macrófagos, las consideró la base fundamental de los mecanismos de defensa que protegen a los organismos contra los distintos agentes patógenos a los que se encuentran expuestos (5, 7). Desde entonces el proceso de fagocitosis se ha estudiado ampliamente. Sin embargo aún hoy no se conocen bien los mecanismos moleculares que regulan y dirigen el proceso de fagocitosis.

El primer paso en el proceso de fagocitosis consiste en la unión de los fagocitos con las partículas que se van a ingerir. A esta unión le sigue la acumulación de filamentos de actina en los fagocitos, por debajo del sitio de adhesión con las partículas que se van a ingerir. El reordenamiento del citoesqueleto de actina es indispensable para la extensión de pseudópodos alrededor de la partícula. Si se bloquea este reordenamiento el proceso de fagocitosis se detiene (6, 8).

Durante la fagocitosis se observa también un reclutamiento de vesículas citoplásmicas hacia las zonas de extensión de los pseudópodos. La membrana de estas vesículas contribuye a la extensión de los pseudópodos (1, 2, 4). La interrupción de este tráfico de membrana aparentemente detiene proceso de fagocitosis (1, 2). Al final del proceso de ingestión los pseudópodos rodean la partícula y ésta es internalizada al citoplasma. Allí se forma una vacuola a la que se fusionan lisosomas, generando así un fagosoma. Es en este organelo donde las enzimas lisosomales destruyen a la partícula que fue internalizada (5, 6, 9).

Aunque distintas células en el organismo pueden presentar fagocitosis de microorganismos o restos celulares (6, 8, 10), los fagocitos del sistema inmunológico poseen dos propiedades que los distinguen de otras células con capacidad fagocítica. Una de estas propiedades es la capacidad de los fagocitos para incrementar la proporción y la eficiencia del proceso fagocítico cuando son activados por diversas sustancias durante el proceso inflamatorio (6, 8, 10). La otra es que presentan un proceso de fagocitosis altamente específico. En este sentido, microorganismos y restos celulares son fagocitados sin que exista daño a las células aledañas (6, 8, 10).

La especificidad del proceso de fagocitosis está dada por interacciones ligando-receptor que se generan entre el fagocito y su blanco (6, 8). La interrupción de estas interacciones detiene el proceso de ingestión (5, 8, 11). A partir de esta observación se propuso el modelo de fagocitosis de "cierre" o "zipper". El modelo de "cierre" consiste en la interacción progresiva de receptores sobre los fagocitos, con ligandos específicos sobre la partícula que se va a ingerir (Fig. 1). Según este modelo, la fagocitosis de una partícula determinada depende de la disponibilidad y la distribución de ligandos sobre su superficie (6, 8, 11).

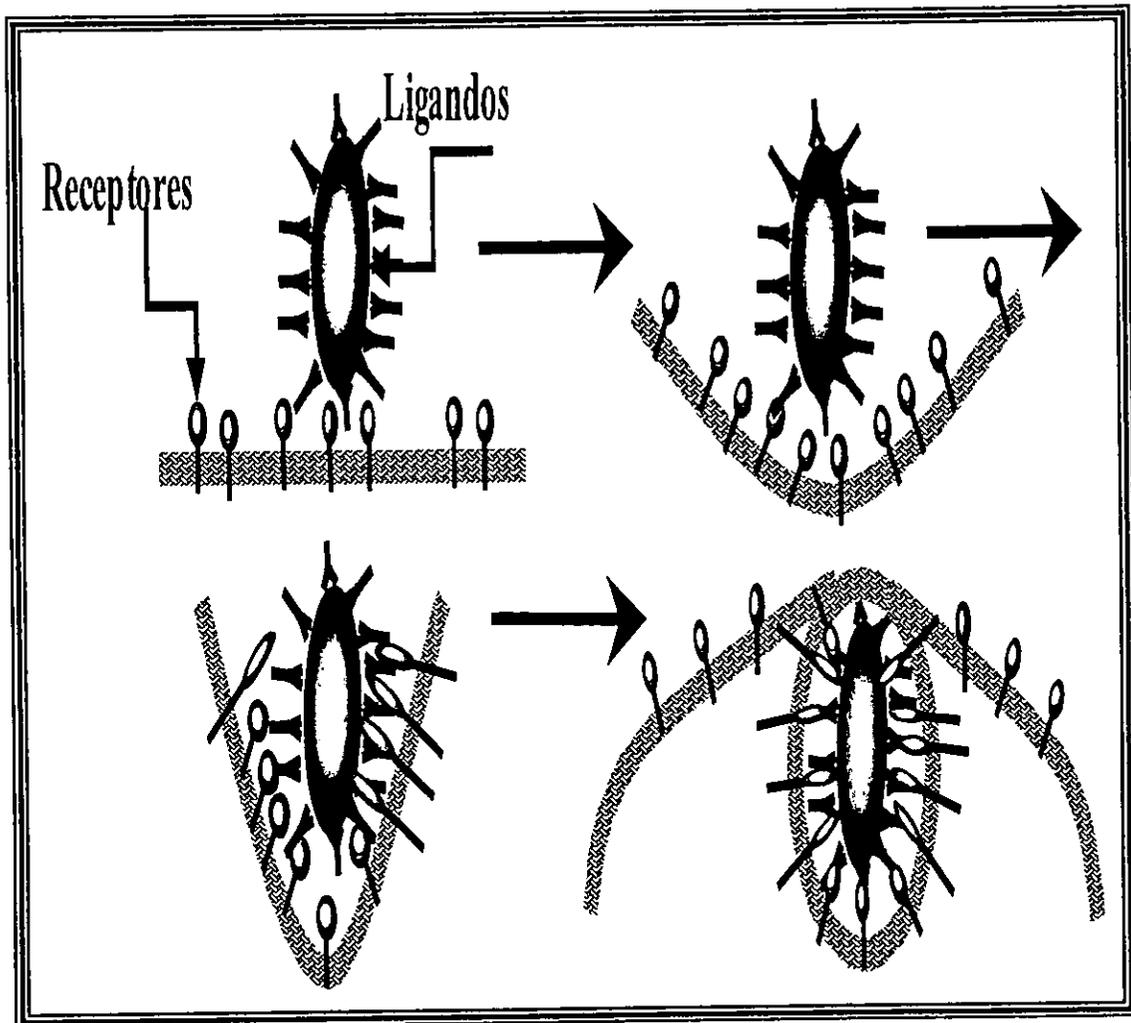


Figura 1. Modelo de "cierre" para el proceso de fagocitosis. el marco del proceso de fagocitosis, en las células del sistema inmunológico, es la interacción progresiva de receptores sobre la célula fagocítica, con ligandos específicos sobre la partícula que se va a ingerir.

II.2 Fagocitos del sistema de defensa del organismo.

Las células que componen el sistema inmunológico pueden dividirse en dos grupos: células del sistema inmunológico innato o inespecífico, y células del sistema inmunológico específico. Es importante señalar el sistema inmunológico innato y el sistema inmunológico específico no son autónomos, y que ambos cooperan para mantener el estado de homeostasis en el organismo. Los sistemas inmunológicos innato y específico se conocen en conjunto como “sistema de defensa”.

Existen tres tipos de fagocitos dentro del sistema de defensa del organismo: monocitos, macrófagos y neutrófilos. Los neutrófilos y macrófagos son considerados fagocitos profesionales debido a que presentan un proceso de fagocitosis muy eficiente, cuando éstos son activados por diferentes sustancias durante el proceso de inflamación (3, 5, 6).

Los monocitos son los precursores en circulación de los macrófagos. Durante el proceso de inflamación los monocitos migran a través de las paredes de los vasos sanguíneos a los sitios de inflamación. Allí los monocitos entran en contacto con moléculas como interferón gama (IFN- γ), ácido retinóico y factor estimulador de colonias (CSFs). La interacción de los monocitos con estas moléculas induce su diferenciación a macrófagos, los cuales son capaces de generar respuestas celulares más eficientes que las de los monocitos, cuando son activados (5, 7). Las principales funciones de los macrófagos durante el proceso de inflamación son: la fagocitosis de microorganismos y restos celulares, la producción de radicales tóxicos de oxígeno durante el estallido respiratorio, la producción de citocinas para regular el curso de la respuesta inflamatoria, y la reparación.

del tejido dañado (5, 7, 9). Los macrófagos juegan además un papel muy importante en la activación del sistema inmunológico específico, pues actúan como células presentadoras de antígenos, induciendo la activación de linfocitos T (5, 6, 9).

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en la sangre. Durante el proceso inflamatorio son las primeras células en llegar a los sitios de inflamación. Las funciones principales de estas células son la liberación de factores proinflamatorios y citocinas que regulan la respuesta inflamatoria, la fagocitosis de microorganismos y la generación de radicales tóxicos de oxígeno (5, 6, 12).

II.3 Receptores para Fagocitosis.

Existen distintos tipos de receptores en los leucocitos, capaces de inducir fagocitosis. Estos receptores se organizan en dos grupos. Un grupo incluye receptores que reconocen componentes de superficie de microorganismos (1, 5, 6, 8, 13), o bien moléculas alteradas sobre la superficie de células apoptóticas (13, 14). En este grupo se encuentran los receptores de manosa, el receptor de polisacárido, y los receptores "scavenger" (5, 8, 13). El otro grupo incluye receptores que reconocen moléculas del hospedero, acumuladas sobre la superficie de microorganismos o sobre sustancias extrañas al organismo (1, 5, 6, 8, 13). Dentro de este grupo se encuentran los receptores para moléculas de la cascada del complemento y los receptores para anticuerpos. El grupo de receptores para anticuerpos ha sido el más estudiado debido a la importancia de estos receptores y de sus ligandos dentro del proceso de inflamación (3, 15).

Los anticuerpos, o inmunoglobulinas, son moléculas de gran importancia dentro del sistema inmunológico pues, además de la inactivación de virus y toxinas, constituyen un

punte entre la inmunidad humoral del sistema inmunológico específico y los mecanismos efectores celulares del sistema inmunológico innato (1, 2). Los anticuerpos están constituidos por dos cadenas polipeptídicas de aproximadamente 50 kilodaltones (kDa), denominadas cadenas pesadas y por dos cadenas polipeptídicas de aproximadamente 25 kDa, llamadas cadenas ligeras. Estas cadenas están unidas por puentes disulfuro (Fig. 2) (3).

Los anticuerpos se unen al antígeno por medio de sus porciones Fab en el extremo amino terminal, e interaccionan con receptores sobre distintas células del sistema de defensa del organismo por medio de su porción Fc en el extremo carboxilo terminal (Fig. 2). Los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas (receptores Fc) se expresan en distintos tipos celulares del sistema de defensa del organismo; principalmente en monocitos y macrófagos, granulocitos, linfocitos B y células cebadas (1, 4). La interacción de la porción Fc de los anticuerpos con sus receptores sobre células del sistema de defensa pone en marcha diferentes mecanismos celulares que contribuyen a la destrucción de microorganismos y a la eliminación de sustancias extrañas al organismo (1).

Existen numerosas respuestas celulares inducidas por el entrecruzamiento de receptores Fc en las diversas células del sistema de defensa. Dentro de estas se encuentran la producción y liberación de citocinas (5, 6), la liberación de enzimas bactericidas y de enzimas proteolíticas (7), la degranulación en células cebadas y en basófilos (8, 9), la citotoxicidad dependiente de anticuerpos en células asesinas naturales (células NK) (10, 11), la activación de la cascada del complemento y finalmente el estallido respiratorio y la fagocitosis por neutrófilos, macrófagos y monocitos (12-17).

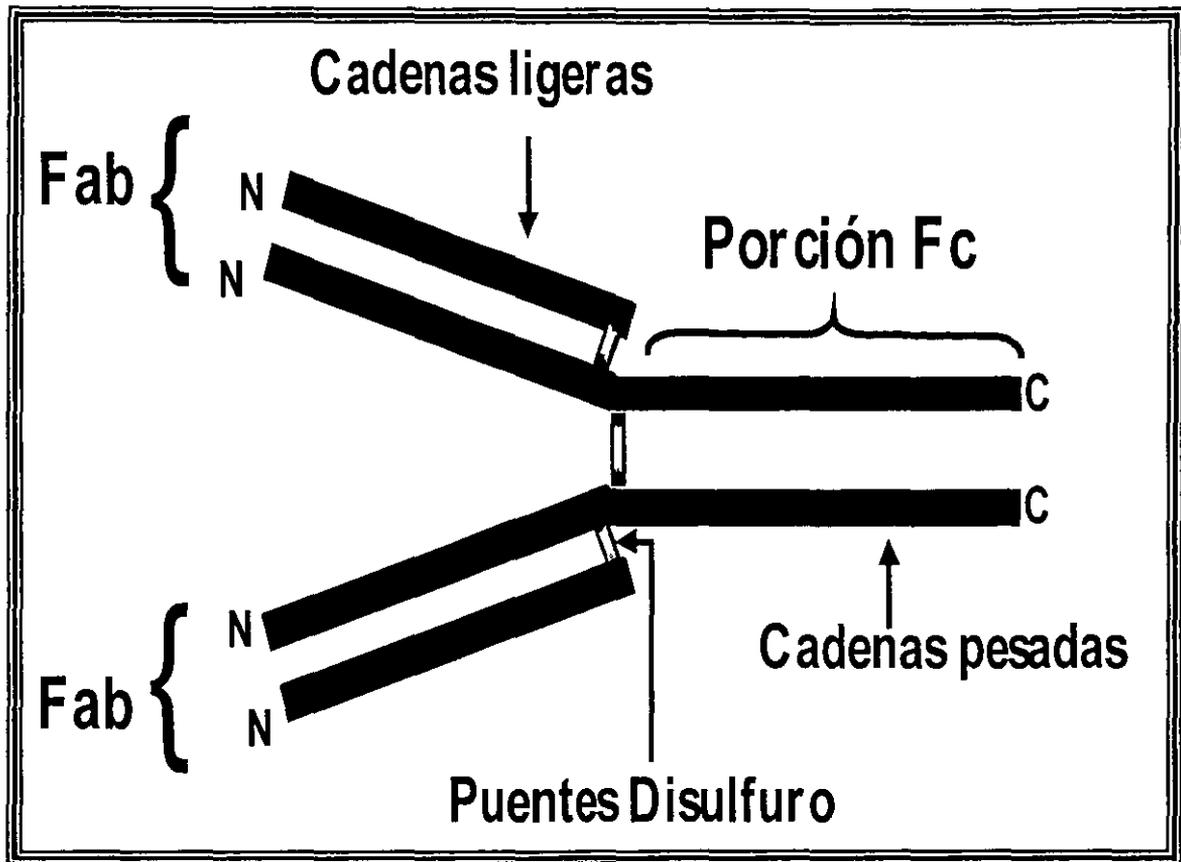


Figura 2. Esquema de una Inmunoglobulina IgG típica. Los anticuerpos o inmunoglobulinas están constituidos por dos cadenas polipeptídicas de aproximadamente 25 kDa llamadas cadenas ligeras, y por dos cadenas de aproximadamente 50 kDa, denominadas cadenas pesadas. Estas cadenas están unidas por puentes disulfuro. Los anticuerpos interactúan con su antígeno por sus porciones Fab, en el extremo amino terminal (N), y con receptores sobre células del sistema inmunológico por su porción Fc, en el extremo carboxilo terminal (C).

II.4 Receptores Fc γ

Existen cinco familias de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Cada familia de inmunoglobulinas cumple funciones específicas dentro del sistema inmunológico. Las inmunoglobulinas G son particularmente importantes en el sistema inmunológico pues son las más abundantes en el suero y son un componente crucial de la inmunidad humoral. Las inmunoglobulinas IgG, al igual que las IgM, son además capaces de iniciar la cascada del complemento. Las respuestas humorales secundarias (i.e. respuestas inmunológicas humorales contra un antígeno al que el organismo ya ha estado expuesto) consisten principalmente en la producción de anticuerpos tipo IgG de alta afinidad (3).

Los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas G (Fc γ Rs) son particularmente importantes para el desarrollo del proceso inflamatorio. La estimulación de Fc γ R genera diferentes respuestas celulares que modulan y dirigen el curso del proceso de inflamación (1, 2, 18). Existen tres clases de receptores Fc γ : Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII (Fig. 3). Cada clase incluye a su vez diferentes subtipos de receptores que están codificados por genes, con distintos grados de homología dentro de cada clase. Los genes que codifican los tipos y subtipos de receptores Fc γ se expresan en forma diferencial en las distintas células del sistema de defensa. (1, 19).

Los receptores de la clase Fc γ RI están constituidos por una cadena α y una cadena accesoria (γ). La cadena α de los receptores Fc γ RI está codificada por tres genes homólogos (A, B y C). La cadena α de Fc γ RI consta de una porción extracelular con tres dominios tipo inmunoglobulina, de una porción transmembranal y de una porción

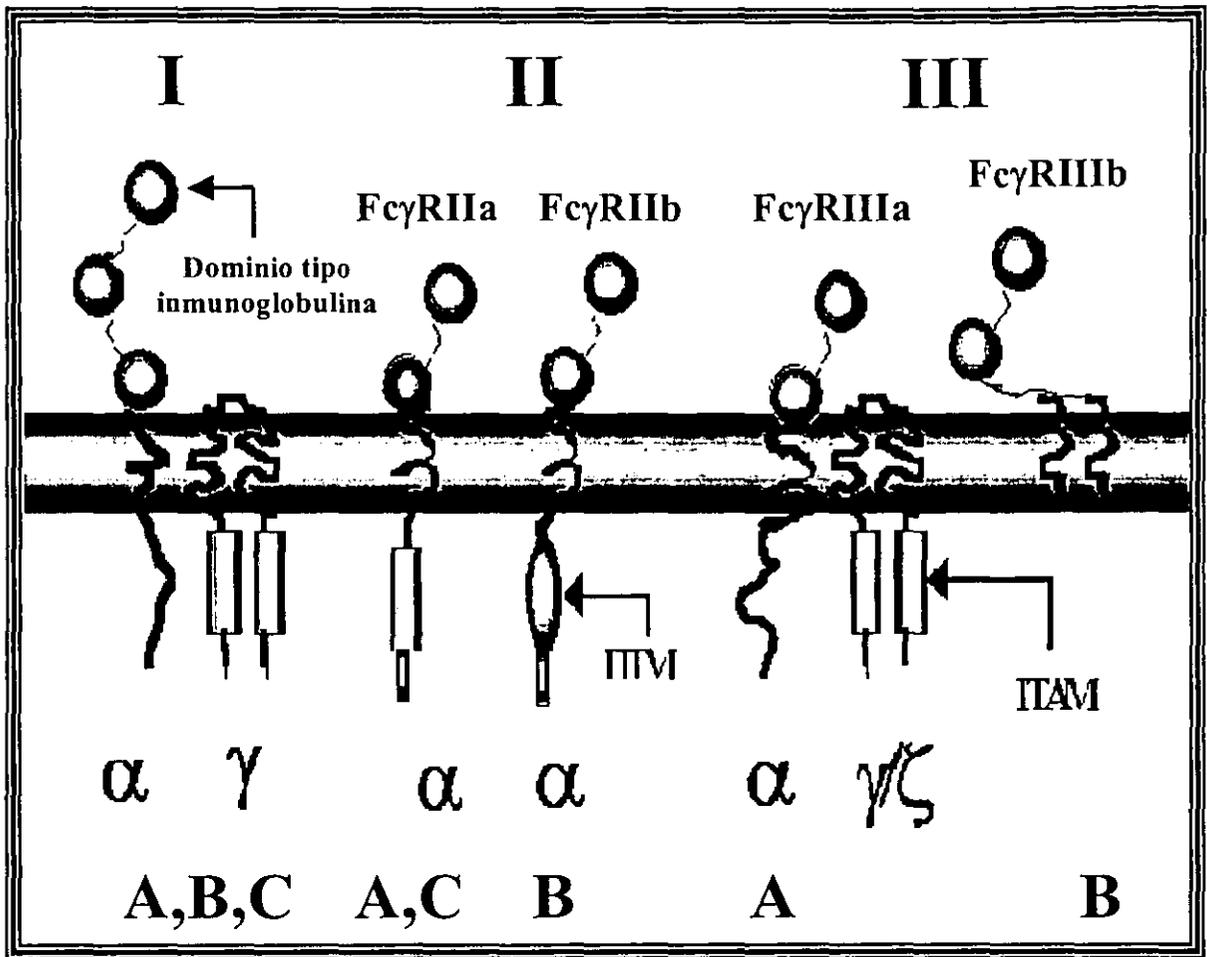


Figura 3. Familia de receptores Fc γ . La familia de receptores Fc γ esta compuesta por tres clases de receptores (I, II y III). A las cadenas que componen cada receptor se asignan letras griegas (α , γ o ζ). Las cadenas α de los receptores Fc γ están codificados por distintos genes a los que se les asignan letras mayúsculas (A, B o C). A los productos polipeptídicos de cada gene se les asignan letras minúsculas (Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa, Fc γ RIIIb). ITIM, región de inhibición basado en tirosinas; ITAM, región de activación basado en tirosinas.

citoplásmica (Fig. 3). Los receptores Fc γ RI son de alta afinidad, capaces de unir inmunoglobulinas libres. Su alta afinidad se debe muy probablemente a los tres dominios tipo inmunoglobulina en su porción extracelular; la cual interactúa con la porción Fc de los anticuerpos (1, 4, 18). La cadena γ de los receptores Fc γ RI se encuentra también asociada con otros receptores, como los receptores Fc ϵ , y los receptores de antígeno de linfocitos T y de linfocitos B (TCR y BCR respectivamente). La cadena γ de Fc γ RI posee en su porción citoplásmica secuencias de aminoácidos conocidos como ITAMs (del inglés "Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif": región de activación basado en tirosinas). Los ITAMs son necesarios para iniciar los eventos de señalización intracelular que desencadenan las distintas respuestas celulares mediadas por los receptores Fc γ (4, 20).

Los receptores Fc γ RII están constituidos por una sola cadena (α), que está codificada por dos genes (A y B) (Fig. 3). Los productos polipeptídicos de estos dos genes (Fc γ RIIa y Fc γ RIIb) tienen funciones antagónicas en las células del sistema de defensa del organismo. El receptor Fc γ RIIa se expresa en diversas células del sistema inmunológico, mientras que el receptor Fc γ RIIb es exclusivo de linfocitos B. Fc γ RIIa y Fc γ RIIb son receptores de baja afinidad y sólo unen inmunoglobulinas agrupadas, como las que se encuentran formando complejos inmunes o sobre la superficie de microorganismos opsonizados. La cadena α de Fc γ RIIa y Fc γ RIIb tienen sólo dos dominios tipo inmunoglobulina en su porción extracelular, un dominio transmembranal y un dominio citoplásmico. El dominio citoplásmico de la cadena α del receptor Fc γ RIIa contiene los ITAMs necesarios para la señalización intracelular y generación de diferentes respuestas

celulares (1, 4, 18). El dominio citoplásmico de la cadena α de Fc γ RIIb posee secuencias de aminoácidos llamados ITIMs (del inglés "Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitor Motif": región de inhibición basado en tirosinas). Los ITIMs, a diferencia de los ITAMs, generan señales negativas capaces de bloquear la activación celular inducida por otros receptores (1, 4).

Los receptores de la clase Fc γ RIII pueden estar constituidos por una cadena α y un dímero de cadenas accesorias γ/γ o γ/ζ . La cadena α de los receptores Fc γ RIII está codificada por dos genes homólogos (A y B). Los productos polipeptídicos de estos genes (Fc γ RIIIa y Fc γ RIIIb) forman receptores de baja afinidad y unen sólo inmunoglobulinas agrupadas. La cadena α de Fc γ RIIIa consta de una porción extracelular con dos dominios tipo inmunoglobulina, de una porción transmembranal, y de una porción citoplásmica (Fig.3). Las cadenas accesorias γ o ζ poseen los ITAMs necesarios para la señalización intracelular (1, 4, 18). El receptor Fc γ RIIIb consta de una sola cadena con dos dominios tipo inmunoglobulina en su porción extracelular, y es exclusivo de neutrófilos. A diferencia del resto de los receptores Fc γ , el receptor Fc γ RIIIb no posee dominios transmembranales ni citoplásmicos. Este receptor se encuentra unido a la membrana por medio de una ancla de glicofosfatidilinositol (Fig. 3). Aunque el receptor Fc γ RIIIb no posee dominios citoplásmicos, éste es capaz de inducir eventos de señalización en el interior de la célula, como elevación en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{+2}]_i$) y polimerización de actina (21-23). Esto sugiere que este receptor podría estar acoplado con otras moléculas en la superficie celular, que a través de dominios citoplásmicos propios puedan desencadenar eventos de señalización intracelular (1, 18).

Aunque las respuestas celulares generadas por entrecruzamiento de receptores Fc γ en los neutrófilos, monocitos y macrófagos son muy semejantes, existen diferencias en cuanto a la expresión de los distintos receptores en las células (Tabla I) . Los neutrófilos expresan constitutivamente receptores Fc γ RIIa y Fc γ RIIIb, y la expresión del receptor Fc γ RI puede inducirse por tratamiento con interferón gama (IFN- γ). Los monocitos expresan receptores Fc γ RIIa, y receptores Fc γ RI y Fc γ RIIIa en menor cantidad. Finalmente, los macrófagos expresan receptores Fc γ RI, Fc γ RIIa y Fc γ RIIIa (18).

	Receptores	Respuestas celulares
Monocitos	<i>FcγRI, FcγRIIa. FcγRIIIa (baja expresión).</i>	Fagocitosis, Estallido respiratorio, Producción y liberación de citocinas
Macrófagos	<i>FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa</i>	Fagocitosis, Estallido respiratorio, Producción y liberación de citocinas
Neutrófilos	<i>FcγRIIa, FcγRIIIb. FcγRI (inducible)</i>	Fagocitosis, Estallido respiratorio, Degranulación.

Tabla I. Expresión de Fc γ R en fagocitos y respuestas celulares mediadas por éstos.

II.5 Transducción de señales por receptores Fcγ

Los receptores Fcγ necesitan ser agregados en la superficie celular por unión a ligandos polivalentes (inmunoglobulinas agrupadas) para iniciar eventos de señalización intracelular (1, 4). Aunque la agregación de cada tipo de receptor Fcγ puede generar eventos de señalización distintos, un evento de señalización que parece ser común a las tres clases de receptores es la activación de cinasas de la familia Src. Estas enzimas fosforilan de los residuos de tirosina dentro de los ITAMs de las distintas cadenas de los receptores. Una vez fosforilados, los ITAMs sirven como sitios de anclaje para cinasas de la familia Syk / Zap70. Estas cinasas se unen a las tirosinas fosforiladas a través de dominios SH2 (del inglés "Src Homology Two": homología dos con Src). Aparentemente esta unión es suficiente para activar a las cinasas de la familia Syk (18).

Los eventos de señalización posteriores a la activación de las cinasas de la familia Syk/Zap70 se conocen sólo parcialmente. Dentro de éstos se han reportado la activación de la enzima fosfatidilinositol 3-cinasa (PI 3-K), la activación de la vía de señalización clásica de la cinasa activada por mitógenos (ERK), el incremento en la concentración de intracelular de calcio ($[Ca^{+2}]_i$), la activación de fosfolipasa C gama (PLCγ), la activación de fosfolipasa A2 (PLA2), la activación de fosfolipasa D (PLD), la activación de proteínas de la familia de proteínas cinasas C (PKC), y al activación de GTPasas pequeñas que modulan el reordenamiento del citoesqueleto, como Rac y Rho (14, 24-27).

Las enzimas específicas que participan en las vías de señalización de los receptores Fcγ varían de acuerdo al tipo de receptor, al tipo celular, y al estado de activación de las células. Cabe mencionar que las distintas respuestas celulares mediadas por FcγRs pueden

ser reguladas por distintas moléculas de señalización. Por ejemplo, en monocitos el entrecruzamiento de receptores Fc γ induce la activación de la enzima ERK en una forma independiente de Ras y Raf, y la activación de esta enzima es necesaria para la producción de citocinas como IL-1 y TNF- α (27, 28). Por otro lado, en células NK, el entrecruzamiento del receptor Fc γ RIIa activa a ERK a través de la vía clásica, que involucra Ras y Raf. En estas células la activación de ERK también es necesaria para la producción de citocinas (29).

El entrecruzamiento de Fc γ Rs en células del sistema inmunológico puede inducir diferentes respuestas celulares, dentro de las que se encuentran la producción y liberación de citocinas y otros mediadores proinflamatorios como prostaglandinas y leucotrienos, la liberación de moléculas bactericidas por degranulación en neutrófilos, el estallido respiratorio y la fagocitosis. Dada la variedad de respuestas celulares que pueden generarse a partir de la estimulación de los receptores Fc γ no resulta sorprendente la gran cantidad de moléculas involucradas en las cascadas de señalización, ni la complejidad de las interacciones que pueden generarse entre ellas. En la actualidad la disección de las vías de señalización utilizadas por cada receptor, y la participación de distintas moléculas en las diferentes respuestas celulares mediadas por los receptores Fc γ , es un campo muy activo de investigación (1, 24, 25, 30).

II.6 Transducción de señales durante la fagocitosis mediada por FcγRs.

Durante la fagocitosis mediada por FcγRs se ha descrito la activación de una serie de moléculas a partir de la activación de Syk, entre ellas están ERK, PI 3-K, PLCγ, PLA, PLD y PKC (Fig. 4). La elevación de la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{+2}]_i$) y la polimerización de actina son otros eventos bioquímicos que se han observado durante la fagocitosis mediada por FcγRs (15).

Citoesqueleto de actina. La polimerización de filamentos de actina se lleva a cabo debajo de las zonas de agregación de los receptores Fcγ. En estas zonas se observa acumulación de distintas proteínas capaces de regular el reordenamiento del citoesqueleto de actina, como paxilina, vinculina, talina y α-actinina, las cuales median el anclaje de las fibras de actina a la membrana (14, 24). Debajo de las zonas de agregación de FcγRs también se observa acumulación de enzimas llamadas miosinas. Las miosinas son ATPasas capaces inducir la contracción de fibras de actina. Estas enzimas proveen la fuerza motriz necesaria para la internalización de las partículas que se están fagocitando (13, 14, 24). Durante el proceso de fagocitosis también se ha observado activación de GTPasas de la familia de Ras, como Rho, Cdc42, Rac1 y ARF6. Las GTPasas de esta familia regulan la polimerización de los filamentos de actina (24, 31). La inactivación de estas enzimas, por ribosilación o por expresión de dominantes negativas de las mismas, inhibe la respuesta fagocítica (32, 33).

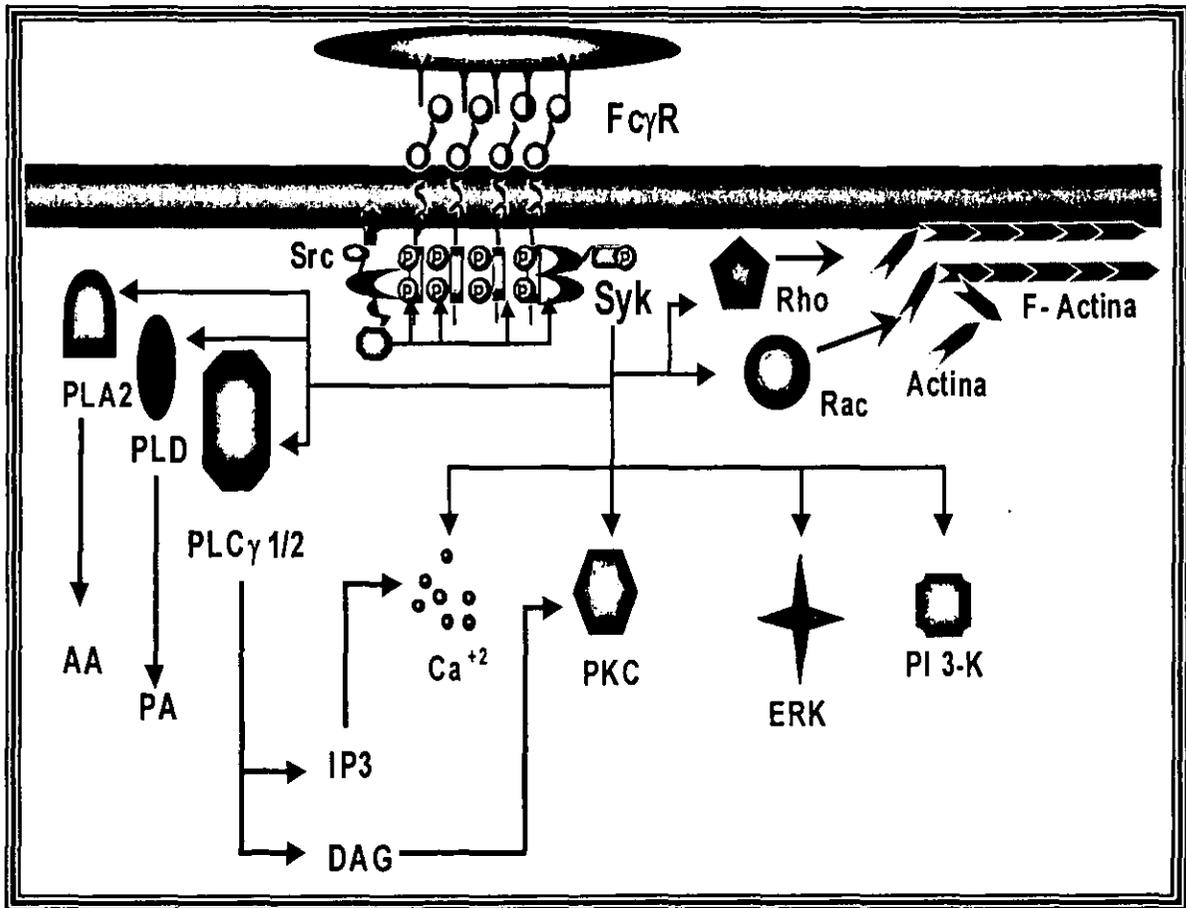


Figura 4. Transducción de señales durante la fagocitosis mediada por Fc γ R. El entrecruzamiento de Fc γ R induce la activación de cinasas de la familia Src y Syk, y su asociación a los dominios citoplásmicos de los receptores. La activación de Syk induce la activación de diversas enzimas, capaces de regular la fagocitosis directamente o a través de segundos mensajeros. Fc γ R, receptores para inmunoglobulinas G; Fosfolipasa A2, PLA2; ácido araquidónico, AA; fosfolipasa gama 1 y 2, PLC γ 1/2; inositol trifosfato, IP3; diacilglicerol, DAG; fosfolipasa D, PLD; ácido fosfatídico, PA; ion calcio, Ca⁺²; cinasa activada por mitógenos, ERK; fosfatidilinositol 3-cinasa, PI 3-K.

Calcio intracelular. El aumento en la $[Ca^{+2}]_i$ es un fenómeno que se observa en algunos leucocitos a partir del entrecruzamiento de Fc γ Rs. Sin embargo, esta molécula parece no tener un papel determinante en el desarrollo de la respuesta fagocítica (14, 15, 24). El tratamiento de neutrófilos y macrófagos con quelantes intracelulares de calcio no tiene efecto sobre respuesta fagocítica mediada por Fc γ Rs en condiciones basales (28, 34-39). Es posible, sin embargo, que la respuesta de calcio sea importante para el proceso de fagocitosis estimulada (14, 24, 39).

Proteína cinasa C. Algunas isoformas de la familia de PKC y substratos de estas enzimas, que participan en la modulación del citoesqueleto de actina (MARKs), se han encontrado localizadas alrededor de los fagosomas durante el proceso de fagocitosis (14, 24, 40). Inhibidores farmacológicos de las enzimas de la familia PKC inhiben la fagocitosis mediada por Fc γ Rs en macrófagos y monocitos, indicando la participación de esta enzima en el proceso de fagocitosis (24, 40). Las isoformas específicas de PKC que regulan el proceso de fagocitosis no están bien definidas (24, 25, 41).

Fosfolipasa C γ 1 y Fosfolipasa C γ 2. En monocitos las enzimas PLC γ 1 y PLC γ 2 son fosforiladas a partir del entrecruzamiento de Fc γ Rs. PLC γ 1 y PLC γ 2 catalizan la formación de inositoltrifosfato (IP $_3$) y daicilglicerol (DAG) a partir de lípidos de membrana (14, 25). El IP $_3$ actúa sobre receptores en el retículo endoplásmico provocando la liberación de Ca^{+2} . Sin embargo la estimulación de Fc γ Rs en neutrófilos puede generar una respuesta de Ca^{+2} independiente de IP $_3$ (22, 25). El papel de IP $_3$ en la fagocitosis mediada por Fc γ Rs

actualmente no está bien definido. Por otro lado el DAG es necesario para la activación de PKC. Esta enzima, como ya se mencionó, participa directamente en el proceso de fagocitosis (24, 25).

Fosfolipasa A2. A partir del entrecruzamiento de FcγRs, se ha reportado también la activación de al menos dos isoformas de PLA₂. Una de ellas es dependiente de Ca⁺², y aunque su actividad es necesaria para el estallido respiratorio, no participa en la respuesta fagocítica (14, 25). Por otro lado, se ha reportado la activación de una isoforma de PLA₂ independiente de Ca⁺², que en fagocitos se ha denominado pPL (del inglés "Phagocytic Phospholipase") (14, 24, 25, 30). La inhibición de esta enzima inhibe la respuesta fagocítica mediada por FcγRs (42, 43). Las enzimas PLA₂ y pPLA catalizan la formación de ácido araquidónico (AA) a partir de lípidos de membrana. El papel de AA en la fagocitosis parece estar relacionado con la regulación del tráfico de membrana necesario para la extensión de pseudópodos alrededor de las partículas fagocitadas (25). El AA también puede ser metabolizado a mediadores proinflamatorios como las prostaglandinas y los leucotrienos. Sin embargo, la inhibición del metabolismo de AA no tiene efecto sobre la respuesta fagocítica (25). Esto sugiere que las prostaglandinas y los leucotrienos, producidos de forma endógena por los fagocitos, no son necesarios para la respuesta fagocítica.

Fosfolipasa D. La enzima PLD cataliza la formación de ácido fosfatídico (PA), a partir de fosfatidil colina. En neutrófilos se ha reportado activación de PLD durante la

fagocitosis mediada por FcγRs (25). En estas células la inhibición de PLD induce la inhibición de la fagocitosis demostrando así su participación en este proceso (24, 25, 44). El PA puede actuar como segundo mensajero activando enzimas como PLCγ, fosfatidilinositol 4-cinasa (PI 4-K) y PLA₂. Por otro lado el PA puede ser metabolizado a DAG, y de esta forma activar a PKC (25). Aunque el mecanismo por el que PLD regula el proceso de fagocitosis no está bien definido, este mecanismo parece estar también relacionado con la regulación del tráfico de membrana necesarios para la extensión de pseudópodos (25).

Cinasa activada por mitógenos. La activación de la enzima ERK, también conocida como MAPK, se ha descrito durante el proceso de fagocitosis mediado por FcγRs en distintos tipos celulares del sistema de defensa del organismo (26, 27, 45-48). ERK pertenece a la familia MAPK de cinasas de serina/treonina. Estas enzimas son reguladas por fosforilación en residuos de treoninas y tirosinas en distintos dominios (49, 50). Dentro de esta familia de cinasas se encuentra también las enzimas JNK. Las enzimas JNK se activan durante situaciones de estrés celular, como la exposición de las células a radiaciones ultravioleta, o por inhibición de la síntesis de proteínas (51). Otro miembro de las cinasas de la familia MAPK es la proteína p38. La activación de esta enzima se ha observado durante la estimulación de monocitos con lipopolisacárido (LPS) y citocinas como interleucina 1 (IL-1) (50).

La enzima ERK, posee dos isoformas; una de 42 kDa y otra de 44 kDa, denominadas ERK-1 y ERK-2, respectivamente. Las enzimas ERK-1 y ERK-2 fueron los primeros miembros de la familia MAPK identificados. Los genes que codifican para estas

enzimas poseen 90 % de homología. Al parecer la actividad enzimática de ERK-1 y ERK-2 es redundante (49). ERK-1 y ERK-2 se relacionaron inicialmente con las vías de transducción de señales de receptores para factores de crecimiento (50). Actualmente estas enzimas se han visto relacionadas con respuestas celulares mediadas por diversos tipos de receptores. Algunas respuestas celulares en que ERK se encuentra involucrada son la modulación del reordenamiento del citoesqueleto y la morfología de la célula, la inducción de genes por estimulación de receptores integrina y de receptores Fcγ, el estallido respiratorio y la fagocitosis (6, 27, 28, 45-49, 52).

La activación de ERK depende principalmente de de la enzimas de la familia MEK, aunque ERK puede también potenciar su activación por autofosforilación en residuos de serina y treonina. La familia de MEK posee tres miembros: MEK-1, MEK-2 y MEK-3. Los genes que codifican para estas enzimas poseen alrededor de 85 % de homología entre si. De los tres miembros de la familia de MEK sólo MEK-1 y MEK-2 son capaces de activar a ERK. MEK es una cinasa de tirosinas y treoninas, que a su vez es activada por fosforilación en residuos de serina (49).

Se conocen diversos substratos para ERK; algunos de ellos son proteínas asociadas al citoesqueleto, proteínas citoplásmicas involucradas en señalización, como el factor de transcripción Elk; y otros son enzimas generadoras de segundos mensajeros, como PLCγ y PLA2 (49, 53). La activación de ERK provoca también su translocación al núcleo. Allí fosforila diversos factores de transcripción modulando así la expresión de genes (49, 50, 53). Aunque ERK es una enzima involucrada en la señalización por FcγR para generar distintas respuestas celulares, la participación de esta enzima en el proceso de fagocitosis parece no ser un hecho general en todos los leucocitos (26).

Fosfatidilinositol 3-cinasa. PI 3-K es una familia de enzimas que participa en la regulación de diversas respuestas celulares. Entre éstas se encuentran la mitogénesis, el reordenamiento del citoesqueleto, la secreción celular y el tráfico vesicular (54, 55). Recientemente se ha reportado también la participación de PI 3-K en el proceso de fagocitosis mediado por FcγRs en algunos leucocitos (28, 56-60). Las enzimas de la familia PI 3-K fosforilan en anillo de inositol en la posición tres (54, 61). Estas enzimas constan de dos subunidades: una subunidad reguladora y una subunidad catalítica. La familia de PI 3-K está compuesta a su vez de tres subfamilias: PI 3-K clase I, PI 3-K clase II, y PI 3-K clase III (61).

Las enzimas de la clase I fosforilan la posición tres del fosfatidilinositol-4-monofosfato (PtdIns (4)P) y del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P₂). Las enzimas PI 3-K de clase I interactúan con la forma activa de la enzima Ras, y pueden formar heterodímeros con proteínas adaptadoras que las conectan con otras vías de señalización (61). Las enzimas PI 3-K clase I se subdividen a su vez en dos clases: I_A y I_B. Las enzimas PI 3-K de clase I_A fueron las primeras en ser descritas y purificadas. Estas enzimas interactúan con dominios SH2 en cinasas de tirosina activadas (54). Los dominios SH2 de estas enzimas se unen a residuos de tirosina fosforilados, localizados en la subunidad catalítica de las enzimas PI 3-K de clase I_A. Las enzimas PI 3-K clase I_B son estimuladas por interacción con las subunidades βγ de proteínas G triméricas, y no interactúan con dominios SH2 en proteínas adaptadoras. Las enzimas PI 3-K clase II sólo fosforilan la posición 3 del PtdIns (4)P. La forma de regulación de este último grupo de enzimas, así como los procesos celulares en que éstas participan no están aun bien definidos (61). Las enzimas PI 3-K clase III fosforilan la posición tres del fosfatidilinositol (PtdIns).

Aparentemente estas enzimas participan en la regulación de tráfico de membrana y morfogénesis de vesículas, durante el metabolismo celular basal (61).

Sólo las enzimas PI 3-K clase I_A se han encontrado relacionadas con el proceso de fagocitosis en leucocitos (25). En adelante nos referiremos solamente a las enzimas PI 3-K clase I_A como "PI 3-K". El mecanismo por el cual PI 3-K regula el proceso de fagocitosis en los distintos leucocitos no está bien definido. PI3-K se ha relacionado, por ejemplo, con la activación de PLD. PLD, como se mencionó anteriormente, participa en el proceso de fagocitosis, aparentemente a nivel del tráfico de membrana necesario para la extensión de pseudópodos.

Otro posible mecanismo de regulación de la fagocitosis por PI 3-K involucra a los productos de su actividad enzimática. Los productos de PI 3-K, fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato (PdtIns 3,4-P₂) y fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PdtIns 3,4,5-P₃), son capaces de activar algunas isoformas de PKC independientes de calcio, como PKCδ y PKCε (25, 55, 62). Tanto PKCδ como PKCε se han detectado alrededor de los fagosomas, sugiriendo que ambas enzimas forman parte de la maquinaria fagocítica (25, 63, 64).

Los productos de PI 3-K, PdtIns 3,4-P₂ y PdtIns 3,4,5-P₃ pueden unirse también a proteínas como profilina y gelsolina, que regulan directamente la dinámica del citoesqueleto de actina (25, 54, 55). La unión de PdtIns 3,4-P₂ y de PdtIns 3,4,5-P₃ a profilina y a gelsolina induce la polimerización de actina y permite la extensión de pseudópodos (25, 55).

PdtIns 3,4,5-P₃ puede también modular el reordenamiento del citoesqueleto de actina a través de la activación de enzimas como Rho y Rac (25, 54, 55). Las formas

activadas de Rho y de Rac participan en la formación de pliegues de membrana ("membrane ruffles") y fibras de estrés, respectivamente. La formación de pliegues de membrana y de fibras de estrés depende de la regulación del citoesqueleto de actina. Existen pues diversos mecanismos por medio de los cuales PI 3-K podría regular el proceso de fagocitosis. Sin embargo, se desconoce si la participación de PI 3-K en el proceso de fagocitosis es un hecho generalizado en todos los leucocitos.

III. OBJETIVOS.

1.- *Determinar el papel de la enzima PI 3-K proceso de fagocitosis mediado por FcγRs en monocitos.* Los monocitos son los precursores en circulación de los macrófagos (3, 14, 65, 66) y presentan una respuesta fagocítica menos eficiente que la de los fagocitos profesionales (3, 14, 65, 66). Dado lo anterior podría esperarse que las enzimas que regulan el proceso de fagocitosis en los fagocitos profesionales no sean las mismas que regulan el proceso de fagocitosis en los monocitos. El papel de PI 3-K en la fagocitosis mediada por FcγRs en los diferentes fagocitos del sistema inmunológico no está bien definido. Aunque se ha reportado que PI 3-K participa en la fagocitosis por FcγRs en neutrófilos y macrófagos (28, 56-60), se desconoce si esta enzima participa en la fagocitosis por FcγRs en monocitos.

2.- *Determinar si la diferenciación de monocitos a macrófagos involucra el reclutamiento de ERK a la maquinaria molecular que regula la fagocitosis en estas células.* Se ha reportado que la enzima ERK es importante para el proceso de fagocitosis por FcγRs en neutrófilos y macrófagos (28, 45-48, 52, 58, 67, 68). Sin embargo en monocitos el proceso de fagocitosis parece ser independiente de esta enzima (26). Dado que los monocitos son los precursores en circulación de los macrófagos (3, 14, 65, 69), la observación de que en monocitos la fagocitosis por FcγRs es independiente de ERK (26) nos sugirió hipótesis de que la diferenciación de monocitos a macrófagos debía involucrar el reclutamiento de ERK a la maquinaria fagocítica de las células.

3.- *Implementar un método alternativo para medir fagocitosis basado en la citometría de flujo, aplicable a estudios sobre los eventos de transducción de señales que regulan el proceso de fagocitosis.* El método tradicional para medir fagocitosis consiste en el análisis microscópico de las células, para determinar el número de partículas ingeridas por una determinada población de células. Aunque este método es muy confiable y preciso toma mucho tiempo y resulta tedioso (70, 71). Aunque se han publicado diferentes métodos para medir fagocitosis por citometría de flujo (CMF) (72-74), todos ellos son aplicables a un solo tipo celular, y en general su uso se ha limitado a análisis de tipo clínico (71, 75-77). En este trabajo se planteó la implementación de un método alternativo para medir fagocitosis basado en la CMF, que pueda aplicarse a estudios sobre los eventos de señalización intracelular que regulan el proceso de fagocitosis, y que sea aplicable a más de un tipo celular.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

Cultivo Celular. Los monocitos humanos de la línea celular THP-1 se mantienen en medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Gibco BRL, Grand Island, NY), glutamina a 20 μ M, penicilina a 50 unidades/ml, y estreptomycin a 50 μ g/ml (78, 79). Los monocitos THP-1 son una línea celular aislada de un paciente con leucemia monocítica aguda (80). Estas células conservan características fenotípicas y características bioquímicas propias de los monocitos normales (78, 80, 81). Para los ensayos de fagocitosis las células se mantuvieron a una densidad de cultivo entre 0.6×10^6 y 0.9×10^6 células/ml.

Reactivos. El inhibidor específico de PI 3-K, wortmanina es de Calbiochem (San Diego, CA). El inhibidor específico de ERK, PD98059, es de New England Biolabs (Beverly, MA). El interferón recombinante humano es de Endogen (Woburn, MA). El resto de los reactivos es de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO).

Purificación de Neutrófilos. Los neutrófilos se purificaron de sangre periférica de adultos humanos sanos como se ha descrito (39). Diez mililitros de sangre se mezclan con 2 ml de dextrán al 6% en PBS, y con 250 unidades de heparina. Esta mezcla se mantiene en reposo durante 45 minutos, para permitir que la mayoría de eritrocitos sedimente. El plasma se transfiere a un tubo de 15 ml con 5 ml de Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). El plasma se coloca sobre el Ficoll-Paque sin mezclar, formando dos fases. El tubo se centrifuga a 1600 rpm, en una centrífuga de mesa (Sorvall, RT6000 D) por 20 minutos, para permitir la separación de las células en el gradiente de Ficoll. Los granulocitos se recuperan del fondo del tubo, se lavan y se resuspenden a 1×10^7 células/ml, antes de

usarse para los ensayos de fagocitosis. Las células purificadas son en su mayoría (aproximadamente 95-97 %) neutrófilos (39).

Opsonización de Eritrocitos de Carnero: Los eritrocitos de carnero (Erikar, S.A. México D.F.) se lavan tres veces con solución de Alsever (dextrosa 0.1 M, ácido cítrico 40 mM, NaCl 10 mM) y se ajustan a una concentración de 1×10^9 células/ml. Un mililitro de esta suspensión se mezcla con 900 μ l de solución de Alsever y 100 μ l de una dilución 1/1000 de suero de conejo contra eritrocitos de carnero. Esta mezcla se incuba a 37 °C por 10 minutos y se lava varias veces para remover los anticuerpos libres (39).

Ensayos de Fagocitosis en Fase Líquida: Los ensayos de fagocitosis con neutrófilos o células THP-1 se realizan básicamente como se ha descrito (39), con algunas modificaciones. Células THP-1 o neutrófilos (2.5×10^5), en 100 μ l de PBS con 1% de albúmina humana (Red Cross Blood Bank, Geneve, Switzerland), cloruro de calcio 2 mM y cloruro de magnesio 1.5 mM, se mezclan con 15 μ l de una suspensión (5×10^8 células/ml) de eritrocitos de carnero o eritrocitos de carnero opsonizados con IgG (EIgG). Las células se incuban a 37 °C durante 15 minutos (neutrófilos) o 1 hora (células THP-1) para permitir la internalización de los eritrocitos. En los ensayos de fagocitosis estimulada con ésteres de fórbol, los fagocitos se tratan con PMA a 100 ng/ml durante el tiempo de incubación con los eritrocitos. Al final de esta incubación los eritrocitos no internalizados se lisan añadiendo 1 ml de una solución fresca de cloruro de amonio al 0.83 %. Esta suspensión se mantiene a temperatura ambiente por 3 minutos y luego se centrifuga en una microcentrífuga por 1 minuto a 6000 rpm. Las células se lavan con 1 ml de PBS y se resuspenden en 3 μ l de suero humano diluido a la mitad con PBS. Esta suspensión se

extiende sobre una laminilla de vidrio. Después de la evaporación del líquido las laminillas se tifican con colorante de Wright (Sigma, St. Louis, MO) por 2 minutos. Las laminillas se lavan con PBS durante 2 minutos, y finalmente con agua destilada en abundancia.

Preparación del Colorante de Wright: Diez miligramos de colorante se disuelven en 50 ml de metanol absoluto. El colorante debe dejarse madurar durante tres días antes de usarse.

Diferenciación de Monocitos THP-1 a Macrófagos. La diferenciación de monocitos THP-1 se llevó a cabo como se ha descrito (78, 82-85). Monocitos THP-1 en RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10 %, se tratan con ácido retinóico 1 μ M por 48 horas. Las células se lavan con medio sin suero y se resuspenden en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 5 %. Las células se tratan entonces con interferón gamma (IFN- γ) a 15 ng/ml por 24 o por 48 horas adicionales. Las células diferenciadas, contrariamente a los monocitos prediferenciados, crecen adheridas a la placa de cultivo. Las células se desprenden de la placa de cultivo con un tratamiento breve con tripsina, se lavan con medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10 % y se resuspenden a 1×10^7 células/ml para los ensayos de fagocitosis.

Preparación de Eritrocitos Fluorescentes. Los eritrocitos de carnero se lavan cuatro veces con solución de Alsever. Dos mililitros de paquete celular se mezclan con dextrán fluoresceinado de 70,000 daltones (Sigma, St. Louis, MO) a 5 mg/ml. Las células mezcladas con el dextrán fluoresceinado se dializan contra una solución hipotónica (fosfato de potasio 5 mM, 2 mM EDTA, pH=7.4), dentro una membrana con exclusión molecular de 3500 daltones, por una hora a 4 °C. Posteriormente las células se dializan contra una solución isotónica (fosfato de potasio 5 mM, NaCl 100 mM, glucosa 5 mM, pH=7.4) a 37

°C por 30 minutos. Finalmente las células se lavan con solución de Alsever varias veces y se resuspenden a una concentración de 1×10^9 células/ml (86). Para los ensayos de fagocitosis las células se opsonizan con una dilución 1/1000 de suero hiperinmune de conejo anti-eritrocitos de carnero, como se describió arriba.

Ensayos de Fagocitosis con Eritrocitos Fluorescentes. Un millón de neutrófilos o de monocitos THP-1 en 400 μ l de PBS con 1 % de albúmina humana, cloruro de calcio 2 mM y cloruro de magnesio 1.5 mM, se mezclan con 60 μ l de una suspensión (5×10^8 células/ml) de eritrocitos de carnero fluorescentes (EF) o eritrocitos de carnero fluorescentes opsonizados con IgG (F-EIgG). Los neutrófilos o los monocitos THP-1 se incuban con los eritrocitos fluorescentes durante 15 minutos o 1 hora respectivamente, a 37 °C. Después de este tiempo los eritrocitos no internalizados se lisan, añadiendo 1 ml de una solución de cloruro de amonio frío al 0.83 %. Esta suspensión se mantiene a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifuga en una microcentrífuga por 1 minuto a 6000 rpm. El sobrenadante se decanta y las células se lavan con 1 ml de PBS. Las células se resuspenden en 1 ml de paraformaldehído al 1 % en PBS para análisis por CMF.

Inmunotinción de Células para Análisis por Citometría de Flujo. Neutrófilos o monocitos THP-1 (1×10^6 células) en 100 μ l de PBS con 0.5 % de albúmina sérica bovina (BSA) y 1 % de sacarosa, se mezclan con 50 μ l de una dilución de anticuerpo monoclonal IB4 (dirigido contra integrinas $\beta 2$) a 50 μ g/ml en PBS. La suspensión de células mezcladas con los anticuerpos se incuba en hielo por 45 minutos. Después de este tiempo las células se lavan y se resuspenden en 100 μ l de PBS con 0.5 % de BSA y 1 % de sacarosa. A esta suspensión se agregan 20 μ l de una dilución 1/10 de fragmentos F(ab')₂ fluoresceinados anti-IgG de ratón. Los controles de células sin tinción se tratan sólo con los fragmentos

F(ab')₂ fluoresceinados. Al final las células se lavan, y se resuspenden en 1 ml de paraformaldehído al 1 % en PBS para su análisis por CMF.

Los eritrocitos opsonizados con IgG (1×10^6 células en 100 μ l de PBS con 0.5 % de albúmina sérica bovina (BSA) y 1 % de sacarosa) se mezclan con 20 μ l de una dilución 1/10 de fragmentos F(ab')₂ fluoresceinados anti-IgG de conejo y se incuban en hielo por 30 minutos. Los controles de células sin tinción son eritrocitos no opsonizados tratados sólo con los fragmentos F(ab')₂ fluoresceinados. Al final los eritrocitos se lavan, y se resuspenden en 1 ml de paraformaldehído al 1 % en PBS para su análisis por CMF.

Análisis de Células por Citometría de Flujo. Para definir las regiones correspondientes a cada tipo celular en análisis tipo dot-plot se utilizaron células marcadas con anticuerpos fluoresceinados. Para ajustar la fluorescencia basal en las inmunotinciones y en los ensayos de fagocitosis con eritrocitos fluorescentes, se utilizaron como referencia células sin marca. En todos los casos se analizaron 10,000 eventos en las regiones de los dot-plots correspondientes a cada uno de los tipos celulares. Para el análisis de fagocitosis por CMF se capturaron exclusivamente los eventos correspondientes a las regiones de neutrófilos y de monocitos. Los datos se capturaron en un citómetro de flujo FACScan (Beckton Dickinson, San Jose CA), con amplificación logarítmica para la dispersión frontal (FSC), para la dispersión lateral (SSC) y para la fluorescencia (FL1).

Análisis estadístico. El índice de correlación entre las curvas dosis-respuesta de fagocitosis se calculó a partir de los valores promedio obtenidos por microscopía de luz y por CMF, para cada punto de la curva (87).

IV.1 Apéndice: ¿Qué es la Citometría de Flujo?

La citometría de flujo (CMF) es actualmente una herramienta muy útil en distintas áreas de la investigación biomédica (3, 74, 88). Utilizando la CMF se pueden hacer estudios relacionados con el ciclo celular, con reacciones celulares de oxidación, con el flujo de iones de calcio intracelular, etc. (3, 88). La CMF ha sido además utilizada ampliamente para determinar la identidad de moléculas expresadas en la superficie de distintas células. Estudios de este tipo han sido de gran importancia en el campo de la inmunología, sobre todo para describir el proceso de maduración de las distintas células que componen el sistema inmunológico (3, 74, 89).

La CMF se basa en el análisis de la luz que se dispersa cuando un haz de luz incide sobre una partícula que pasa frente a éste (Fig. 5). Los citómetros de flujo utilizan por lo general la luz de un láser, pues ésta es muy intensa y puede ser enfocada en un área muy pequeña. Aunque el diámetro de la mayoría de las células es de a penas unas micras, la luz de un láser puede ser enfocada casi en su totalidad sobre la superficie de partículas con las dimensiones de una célula. Cuando un láser incide sobre una célula tienen lugar una serie de procesos físicos, propios de las radiaciones electromagnéticas (como es la luz). Estos son: reflexión, refracción y difracción. El análisis de la luz reflejada y difractada por una partícula da un estimado de la complejidad de la superficie, y de la granularidad de la partícula. La luz que se desvía por reflexión y por refracción se analiza en conjunto y se le llama "dispersión lateral" (SSC, del inglés "Side Scatter") (Fig. 5). La luz que se desvía por difracción se analiza por separado y da un estimado del tamaño de la partícula. A la luz que

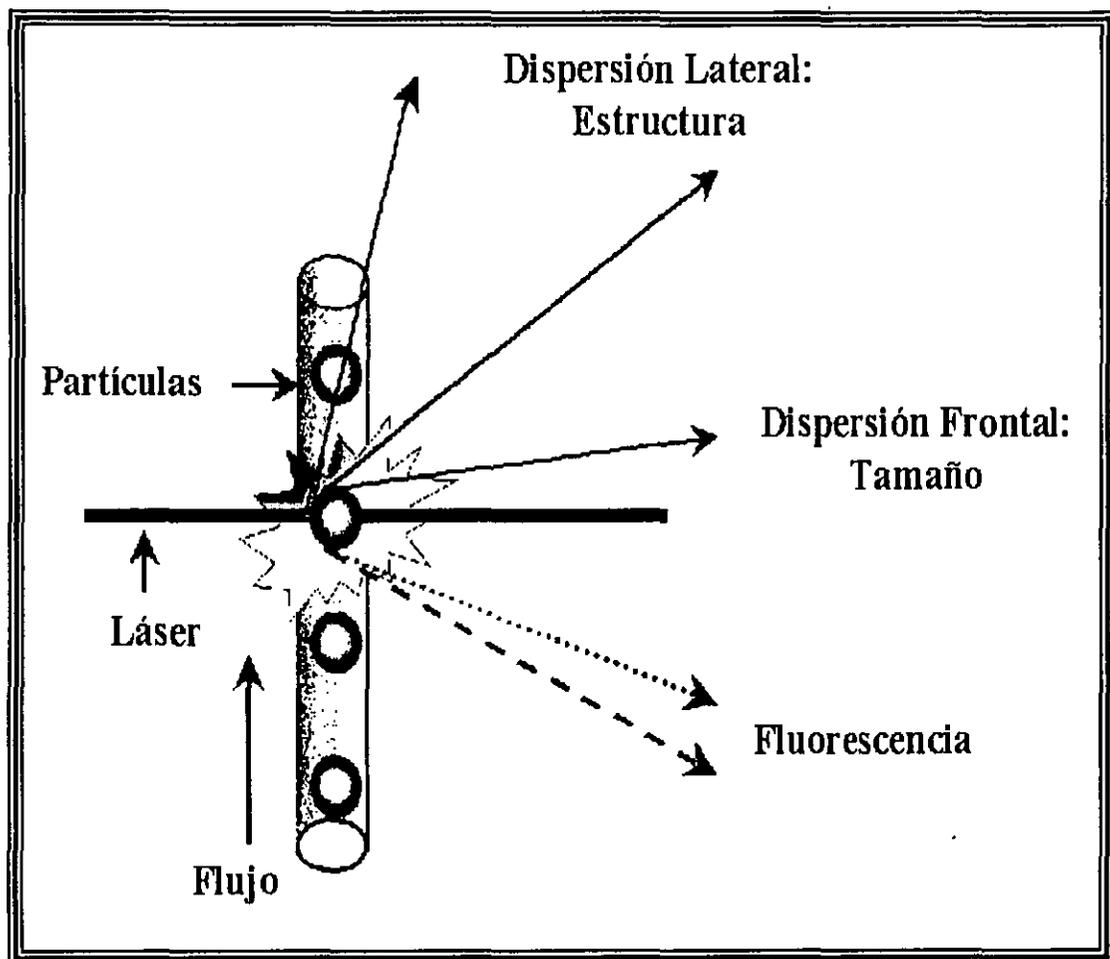


Figura 5. **Dispersión de la luz de un láser por una partícula en un citómetro de flujo.**

La luz un láser se desvía cuando éste incide sobre una partícula. En un citómetro de flujo el paso de partículas frente al láser es continuo, y puede analizarse por separado la luz desviada por cada partícula. El análisis de la luz reflejada y de la luz difractada por una partícula (Dispersión lateral) da un estimado de la estructura de la partícula; particularmente de la regularidad de su superficie y de su granularidad interna. El análisis de la luz difractada (Dispersión frontal) da un estimado del tamaño de la partícula. La luz de un láser puede también excitar los electrones de fluorocromos en la partícula. La luz emitida por fluorocromos (fluorescencia) es de menor longitud de onda que la luz del laser, y puede analizarse por separado.

se desvía por difracción se le llama “dispersión frontal” (FSC, del inglés “Forward Scatter”) (Fig. 5). Un láser es también capaz de excitar los electrones de moléculas especiales, llamadas fluorocromos, de forma que éstos ocupen niveles energéticos más altos. Los electrones de estas moléculas regresan a su estado energético basal emitiendo energía en forma de luz. Este tipo de luz se conoce cómo “fluorescencia” y posee una longitud de onda menor a la del láser con que se generó. Un citómetro de flujo es capaz de detectar la fluorescencia de una partícula marcada con diferentes fluorocromos (Fig. 5). Una propiedad importante de los citómetros de flujo es que pueden analizar por separado la luz que desvía cada partícula, así como la fluorescencia de cada una de ellas. La velocidad del flujo de partículas frente al láser permite entonces analizar millones de partículas en cuestión de minutos (3, 74, 88).

En un citómetro de flujo existe un arreglo de lentes y detectores especiales que hace posible el análisis diferencial de la luz que emite cada partícula (Fig. 6). La luz generada por dispersión frontal y por dispersión lateral, así como la luz fluorescente, es recolectada por a un sistema de lentes llamados colectores, que la dirige a detectores de luz llamados fotomultiplicadores (Fig. 6). Éstos transforman las señales luminosas en señales eléctricas, que se analizan con ayuda de una computadora. La luz generada por dispersión lateral y la fluorescencia convergen en un mismo lente colector que las dirige a espejos dicróicos (Fig. 6). Estos espejos sólo reflejan la luz con un rango de longitud de onda particular. De esta forma la luz generada por dispersión lateral puede ser separada de la luz fluorescente y ser dirigida a un fotomultiplicador adecuado (Fig. 6). Antes de llegar a los fotomultiplicadores, la luz proveniente de los espejos dicróicos pasa por un filtro, que sólo permite el paso de luz con una longitud de onda bien determinada (Fig. 6). Distintos fluorocromos emiten luz

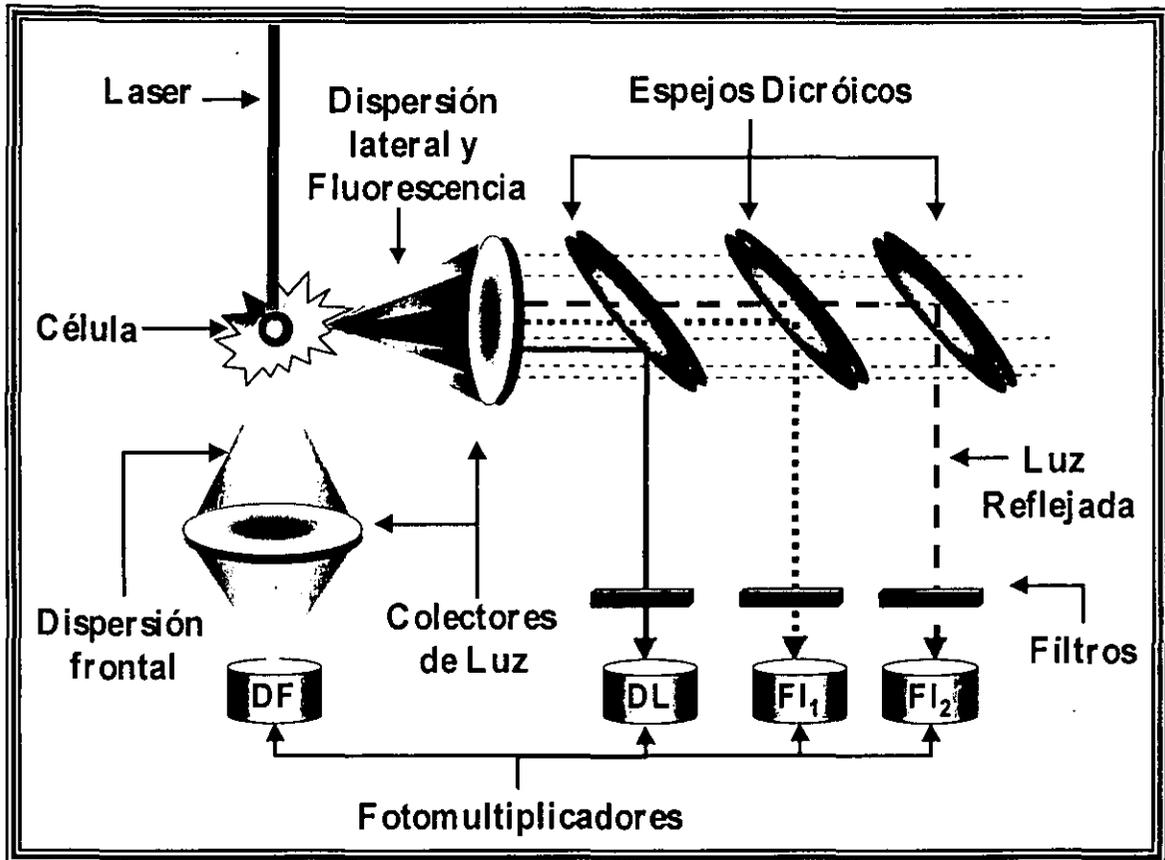


Figura 6. Arreglo de lentes en un citómetro de flujo. La fluorescencia y la luz generada por dispersión del láser inciden sobre lentes llamados colectores. Éstos dirigen la luz a los fotomultiplicadores que convierten las señales luminosas en señales eléctricas. La luz generada por dispersión frontal pasa directamente del colector a un fotomultiplicador (DF). La luz generada por dispersión lateral y la fluorescencia convergen en un mismo colector. Éste dirige la luz a espejos que sólo reflejan la luz dentro de cierto rango de longitudes de onda (espejos dicroicos). La luz generada por dispersión lateral puede ser separada de la luz fluorescente para dirigirse a un fotomultiplicador adecuado (DL). La luz reflejada por los espejos dicroicos pasa por filtros que sólo permiten el paso de luz con una longitud de onda bien determinada. Distintos fluorocromos emiten luz a longitudes de onda diferentes. La luz que emiten distintos fluorocromos puede ser analizada por separado dirigiendo la luz de cada uno a diferentes fotomultiplicadores (FL₁ y FL₂).

a longitudes de onda diferentes. Esto permite que los citómetros de flujo puedan analizar de forma simultánea la luz que emiten distintos fluorocromos en una misma partícula (Fig. 6). Un citómetro de flujo provee entonces información de tres tipos: tamaño de las partículas (FSC), granularidad interna y regularidad superficial (SSC), e intensidad de fluorescencia. El análisis de tamaño y granularidad de las células se realiza por medio de gráficos denominados "mapa de puntos" o "dot-plot" (Fig. 7). En un dot-plot los valores de tamaño y granularidad se grafican en dos ejes. De esta forma, cada punto representa una partícula con un valor de tamaño y de granularidad específico (Fig. 7). Las propiedades de tamaño y granularidad de distintas células permiten distinguir a tipos celulares particulares dentro de una mezcla. La citometría de flujo permite analizar por separado grupos de células que en un dot-plot constituyen poblaciones independientes (Fig. 7).

Existen diversas formas de marcar células con fluorocromos. El método utilizado para marcar a las células dependerá del tipo de ensayo que se realice y de la información que de éste se quiera obtener. Uno de los métodos de marcado fluorescente más común consiste en la utilización de anticuerpos dirigidos contra moléculas de superficie de las células. Los anticuerpos pueden acoplarse a distintos fluorocromos. De esta forma, la detección de fluorescencia en las células se considera indicativo de la expresión (en la superficie celular) de la molécula reconocida por los anticuerpos. El análisis de la fluorescencia en poblaciones de células se hace generalmente por medio de histogramas (Fig. 8). En ellos se grafican los valores de fluorescencia sobre la abscisa y el número de células con cada valor de fluorescencia en la ordenada (Fig. 8).

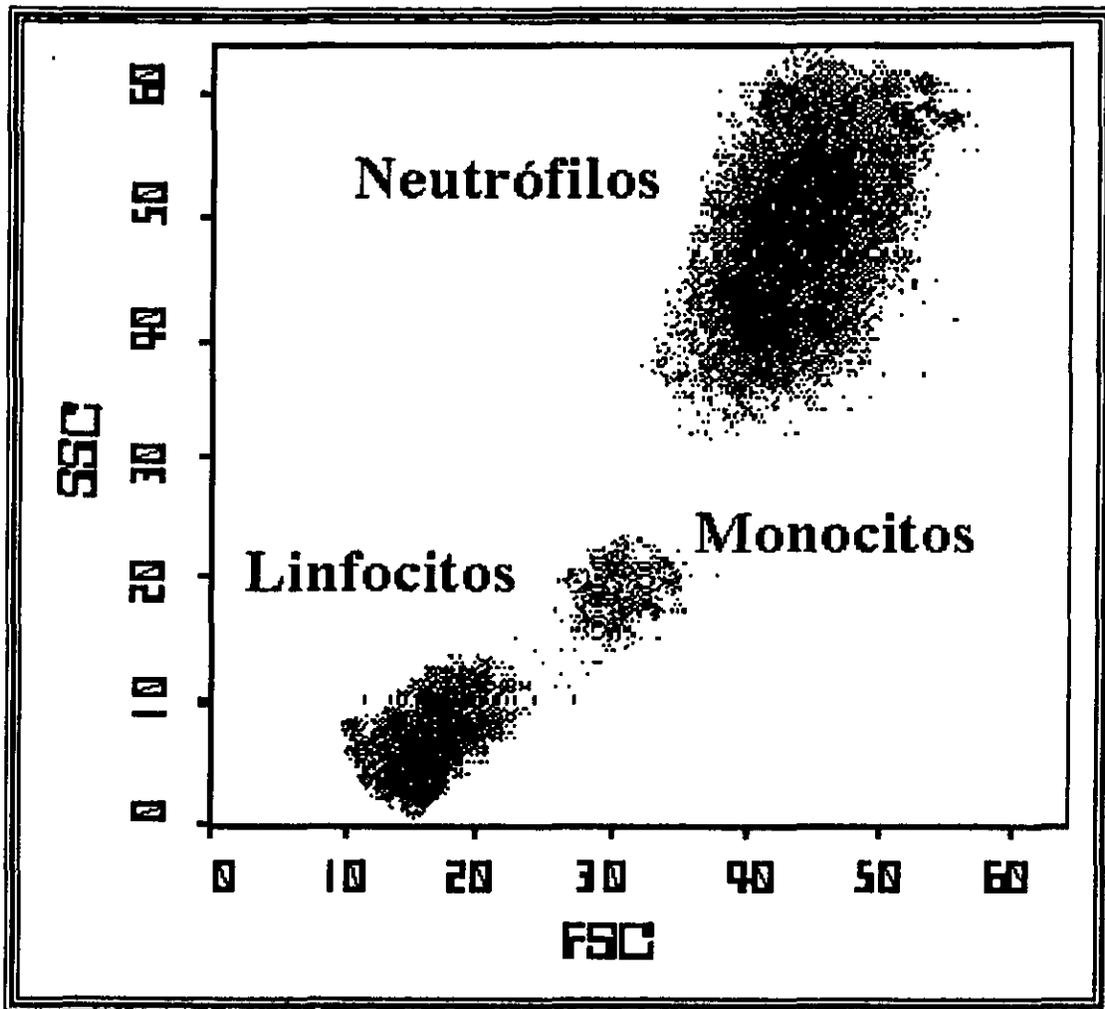


Figura 7. Mapa de puntos, o “dot-plot” de una mezcla de leucocitos. Un mapa de puntos o “dot-plot” representa un análisis de las propiedades de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) de un conjunto de células. En un dot-plot cada punto representa una célula con valores de tamaño y granularidad particulares. Distintos tipos celulares poseen propiedades de tamaño y granularidad características. De esta forma pueden analizarse por separado diferentes poblaciones dentro de una mezcla con distintos tipos celulares. Dentro de una mezcla de leucocitos los neutrófilos, los monocitos y los linfocitos aparecen como poblaciones independientes.

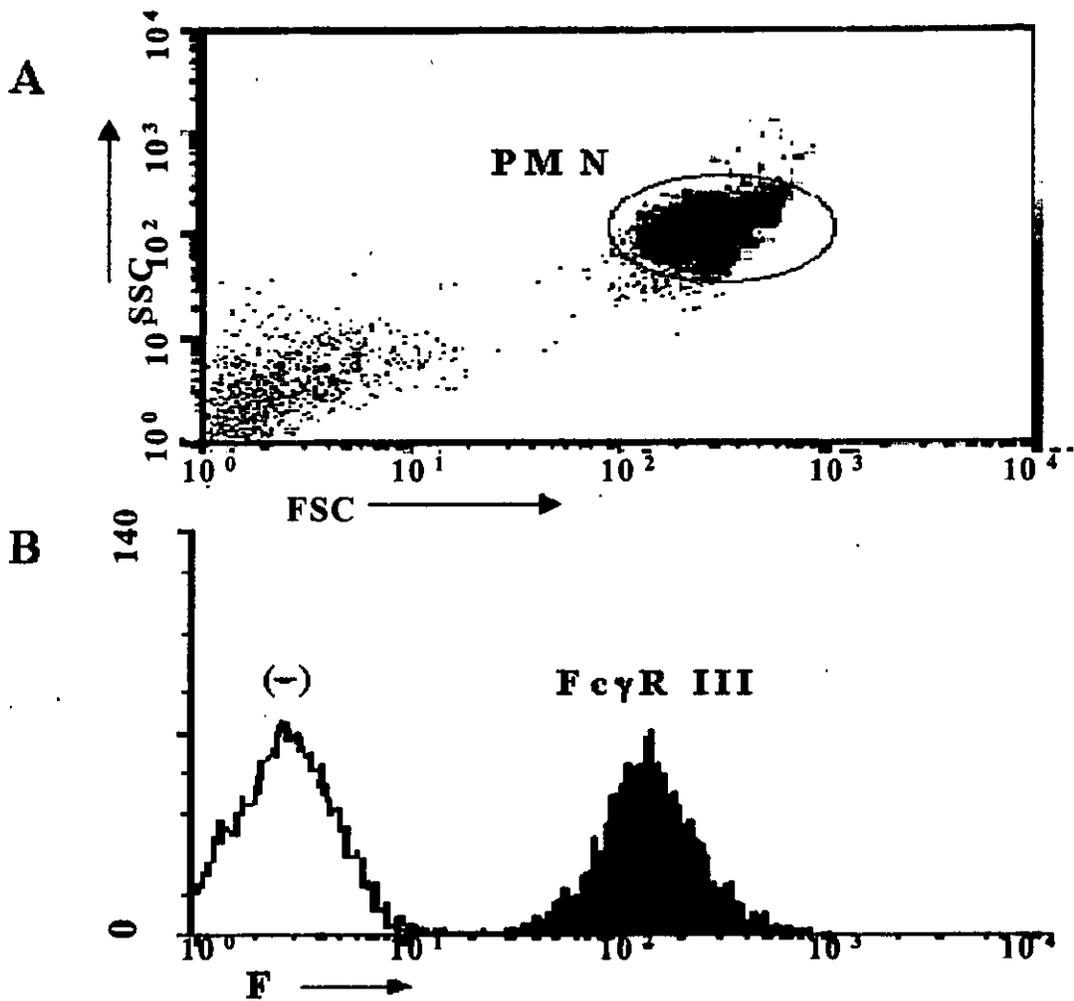


Figura 8. Análisis de fluorescencia por medio de histogramas. Para un análisis de fluorescencia debe seleccionarse en un dot-plot la población de células que se desea analizar (A). En base a esta selección se generan histogramas, donde se grafican los distintos valores de fluorescencia (F) en la abscisa, y el número de células con cada valor de fluorescencia en la ordenada (B). En este caso neutrófilos humanos (PMN) fueron marcados con anticuerpos contra el receptor para inmunoglobulinas Fc γ RIII. En B se muestran los histogramas superpuestos de las células no marcadas (-) y las células marcadas con anticuerpos anti Fc γ RIII (Fc γ RIII).

La CMF permite analizar por separado poblaciones celulares específicas dentro de una mezcla. La base del análisis son las propiedades de tamaño, granularidad y fluorescencia de cada célula. Es importante señalar que la CMF permite el análisis de grandes poblaciones celulares en tiempos muy cortos. Esta propiedad, así como su versatilidad para el estudio de distintas funciones celulares, colocan actualmente a la CMF como una herramienta de gran utilidad en la investigación biomédica.

V. RESULTADOS.

V.1 Reclutamiento de PI 3-K y ERK para fagocitosis por FcγRs durante la diferenciación de monocitos.

V.1.1 Las enzimas PI 3-K y ERK participan en el proceso de fagocitosis mediado por FcγRs en neutrófilos. Se ha reportado que las enzimas PI 3-K y ERK participan en el proceso de fagocitosis mediado por FcγRs en fagocitos profesionales (28, 45-48, 52, 56-60, 67, 68). Decidimos confirmar estos resultados para asegurar que los inhibidores de ambas enzimas (wortmanina y PD98059) actuaran específicamente sobre la fagocitosis mediada por FcγR. Los inhibidores de PI 3-K y ERK se utilizaron bajo condiciones descritas anteriormente (26, 46-48, 57, 59). Los neutrófilos presentaron un índice de fagocitosis (número de partículas ingeridas por cada 100 células) alrededor de 15 con eritrocitos no opsonizados. El índice de fagocitosis de los neutrófilos fue de alrededor de 30, cuando ingirieron eritrocitos opsonizados con IgG (EIgG) (Fig.9). La diferencia entre el índice de fagocitosis de E y el índice de fagocitosis de EIgG representa la respuesta fagocítica mediada por FcγR. El tratamiento de neutrófilos con wortmanina (inhibidor de PI 3-K) y con PD98059 (inhibidor de ERK) bloqueó completamente el incremento en fagocitosis mediado por FcγRs (Fig. 9). La fagocitosis de eritrocitos no opsonizados no se vio afectada por ninguno de los inhibidores. Estos resultados indican que los inhibidores wortmanina y PD98059 bloquean específicamente la respuesta fagocítica mediada por FcγRs (Fig. 22).

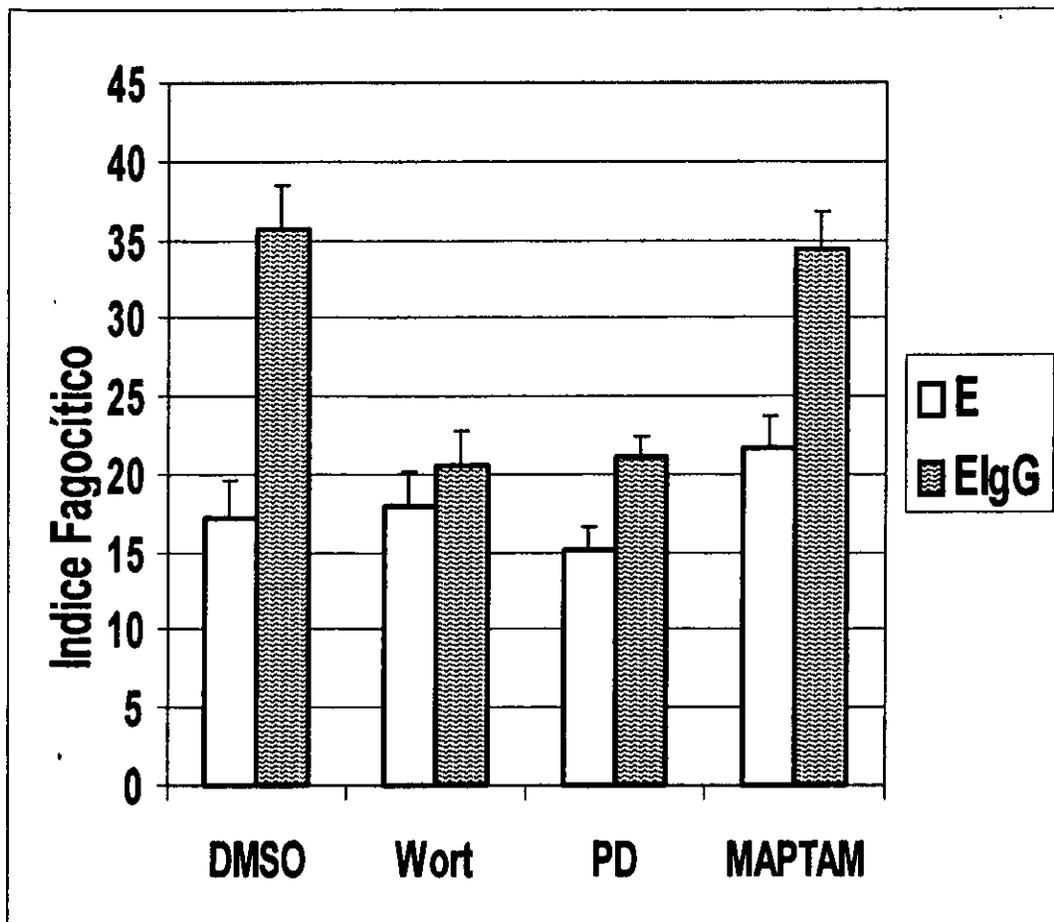


Figura 9. Las enzimas PI 3-K y ERK participan en la fagocitosis mediada por Fc γ R en neutrófilos. Neutrófilos humanos se mezclaron con eritrocitos de carnero (E), o eritrocitos de carnero opsonizados con IgG (EIgG), y se incubaron a 37 °C por 15 minutos para permitir la internalización de los eritrocitos. Los neutrófilos se trataron con 50 nM wortmanina (Wort) por 30 minutos, con 30 μ M PD98059 (PD) por 15 minutos, con 125 μ M MAPTAM por 45 minutos, o bien sólo el disolvente dimetilsulfóxido (DMSO), antes de mezclarlos con los eritrocitos. Los datos se expresan como índice fagocítico (número de partículas ingeridas por 100 células). Los datos son promedio \pm error estándar de un total de seis determinaciones.

Uno de los eventos bioquímicos observados a partir de la estimulación de FcγRs en leucocitos, es el incremento en la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{+2}]_i$). Se ha reportado que en distintos leucocitos la fagocitosis mediada por FcγRs es independiente de los cambios en la $[Ca^{+2}]_i$. Por esta razón decidimos utilizar un quelante intracelular de calcio (MAPTAM) como control adicional, esperando que la respuesta fagocítica mediada por FcγRs no se viera afectada. El tratamiento de neutrófilos con MAPTAM bloqueó la respuesta de calcio inducida por entrecruzamiento de FcγRs (Datos no mostrados), sin embargo no tuvo efecto sobre la respuesta fagocítica de estas células (Fig. 9). Estos resultados indican que la fagocitosis mediada por FcγRs en neutrófilos es, como se esperaba, independiente de la elevación de $[Ca^{+2}]_i$.

V.1..2 El proceso de fagocitosis mediado por FcγRs en monocitos es independiente de PI 3-K. Se sabe que los monocitos son células fagocíticas pocoeficientes (3, 14, 65, 66, 82). En general resulta difícil detectar niveles de fagocitosis significativos en estas células. En este trabajo observamos que la eficiencia de fagocitosis de EIgG en monocitos de la línea celular THP-1 cambia en función de la densidad celular (Fig. 10). Los índices de fagocitosis más altos se observaron en cultivos con densidad al alrededor de 0.8×10^6 células/ml. Células cultivadas a mayores densidades presentaron niveles de fagocitosis claramente menores. Aunque desconocemos por qué la respuesta fagocítica de monocitos parece ser dependiente de la densidad del cultivo, es posible que moléculas producidas por las células en cultivo puedan modular el estado de activación de

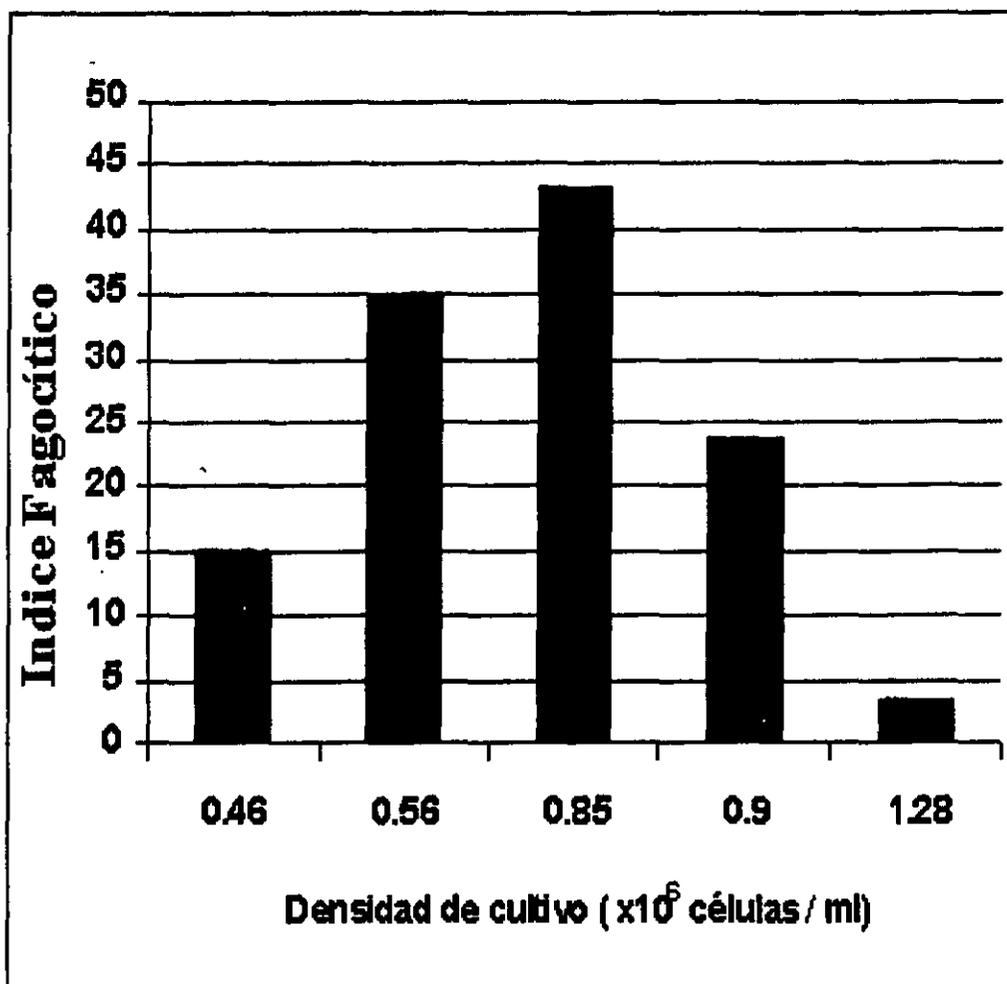


Figura 10. La eficiencia de fagocitosis por monocitos THP-1 cambia con la densidad del cultivo. Células THP-1 se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino por 24 horas a diferentes densidades. Las células se mezclaron con eritrocitos de carnero opsonizados con IgG y se incubaron a 37° C por 1 hora para permitir la internalización de los eritrocitos. Los datos se expresan como índice fagocítico (número de partículas ingeridas por 100 células) de un experimento representativo.

estas células (ver sección de discusión). Para los ensayos de fagocitosis subsecuentes se utilizaron células cultivadas a una densidad de al alrededor de 0.8×10^6 células/ ml.

Los monocitos presentaron un índice de fagocitosis de eritrocitos no opsonizados semejante al de los neutrófilos (Fig. 11). Al igual que los neutrófilos, los monocitos ingirieron con mayor eficiencia EIgG que eritrocitos no opsonizados (E). La diferencia entre el índice de fagocitosis de E y el índice de fagocitosis de EIgG representa la fagocitosis mediada por FcγRs. En contraste con los resultados observados con neutrófilos, wortmanina no tuvo efecto sobre el índice de fagocitosis de EIgG en monocitos (Fig. 11). Por otra parte, se ha reportado que ERK no participa en la fagocitosis por FcγRs en monocitos (26). Como se esperaba, PD98059 no tuvo ningún efecto sobre el nivel de fagocitosis de EIgG de estas células (Fig. 11). Es importante señalar que en los monocitos THP-1 el entrecruzamiento de FcγRs indujo la activación de PI 3-K y de ERK. La activación de PI 3-K y de ERK fue bloqueada por wortmanina y por PD98059 respectivamente (Datos no mostrados). Al igual que en neutrófilos, el tratamiento de monocitos con MAPTAM bloqueó la elevación de $[Ca^{+2}]_i$ inducida por entrecruzamiento de FcγRs (Datos no mostrados). Sin embargo este tratamiento no tuvo efecto sobre el nivel de fagocitosis de EIgG (Fig. 11). Estos resultados indican que en monocitos las enzimas PI 3-K y ERK no participan en el proceso de fagocitosis mediada por FcγRs, y también que al igual que en neutrófilos, la elevación de la $[Ca^{+2}]_i$ no es necesaria para la fagocitosis por FcγRs.

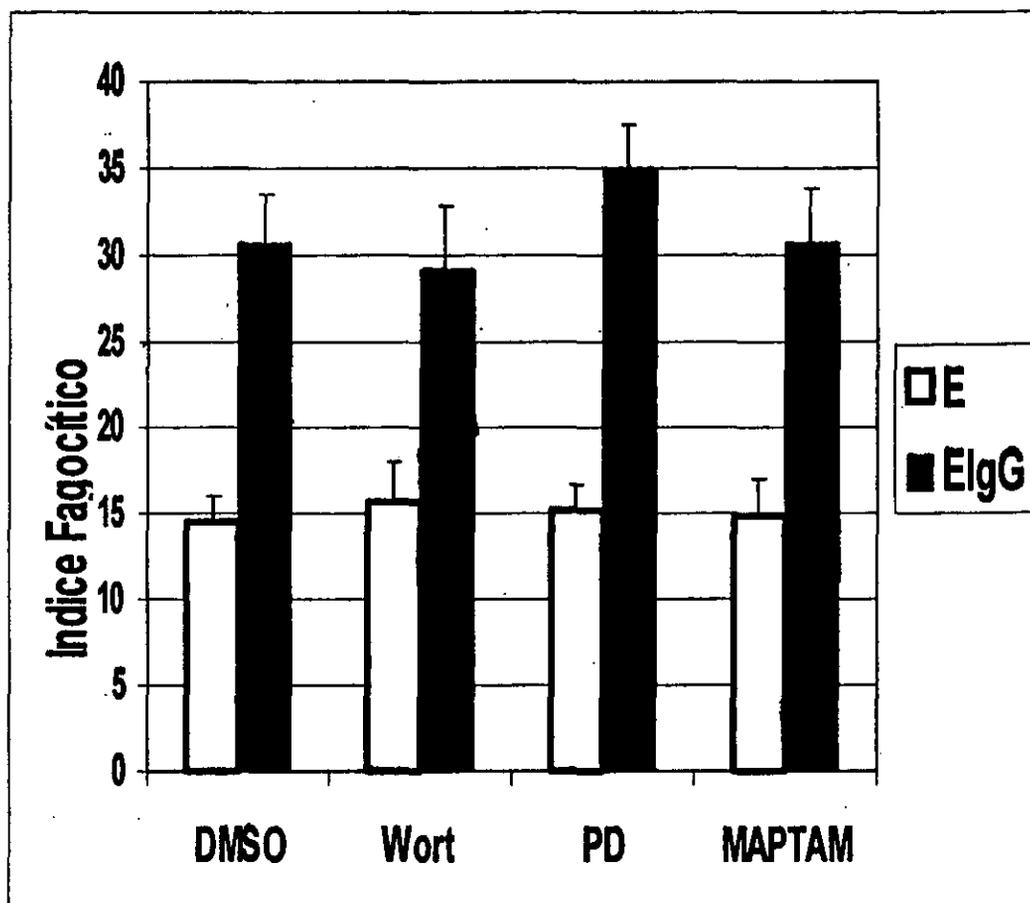


Figura 11. La fagocitosis mediada por $Fc\gamma R$ en monocitos es independiente de ERK y PI 3-K. Células THP-1 se mezclaron con eritrocitos de carnero (E), o eritrocitos de carnero opsonizados con IgG (EIgG) y se incubaron a $37^{\circ} C$ por 1 hora para permitir la internalización de los eritrocitos. Los monocitos se trataron con 50 nM wortmanina (Wort) por 30 minutos, con 30 μM PD98059 (PD) por 15 minutos, con 125 μM MAPTAM por 45 minutos, o bien sólo el disolvente dimetilsulfóxido (DMSO), antes de mezclarlos con los eritrocitos. Los datos se expresan como índice fagocítico (número de partículas ingeridas por 100 células). Los datos son promedio \pm error estándar de un total de doce determinaciones.

V.1.3 Las enzimas PI 3-K y ERK son reclutadas para la fagocitosis por FcγRs durante la diferenciación de monocitos. Diferentes reportes indican que las enzimas PI 3-K y ERK son importantes para el proceso de fagocitosis en macrófagos (45, 56-58, 60). Los resultados que presentamos en la sección anterior demostraron sin embargo, que los monocitos no utilizan PI 3-K ni ERK para la fagocitosis mediada por FcγRs. Dado que los monocitos son los precursores en circulación de los macrófagos estos resultados implicaban por lo tanto, que PI 3-K y ERK debían ser reclutadas a la maquinaria fagocítica., durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos. Para probar esta hipótesis diferenciamos monocitos THP-1 a macrófagos, utilizando ácido retinóico e interferón gamma (IFN-γ) bajo condiciones descritas anteriormente (78, 82-85). Utilizamos después las células diferenciadas, para medir fagocitosis en presencia de los inhibidores de PI 3-K y de ERK.

Los monocitos crecen normalmente como una suspensión de células aisladas (Fig. 12A). El tratamiento de estas células con ácido retinóico por 48 horas y por 24 horas adicionales con IFN-γ, indujo su diferenciación a células con fenotipo de macrófagos. Estas células se caracterizaron por su adhesión a la placa de cultivo y por la formación de agregados celulares (Fig. 12B). Los cambios en las propiedades adhesivas y de agregación celular se observaron de forma más evidente después de 48 horas de cultivo con ácido retinóico y 48 horas adicionales con IFN-γ (Fig. 12C). Para los ensayos de fagocitosis las células diferenciadas se desprendieron de la placa de cultivo por medio de un tratamiento breve con tripsina. Antes de cada ensayo las células se lavaron varias veces con medio RPMI-1640 para inactivar y eliminar la tripsina.

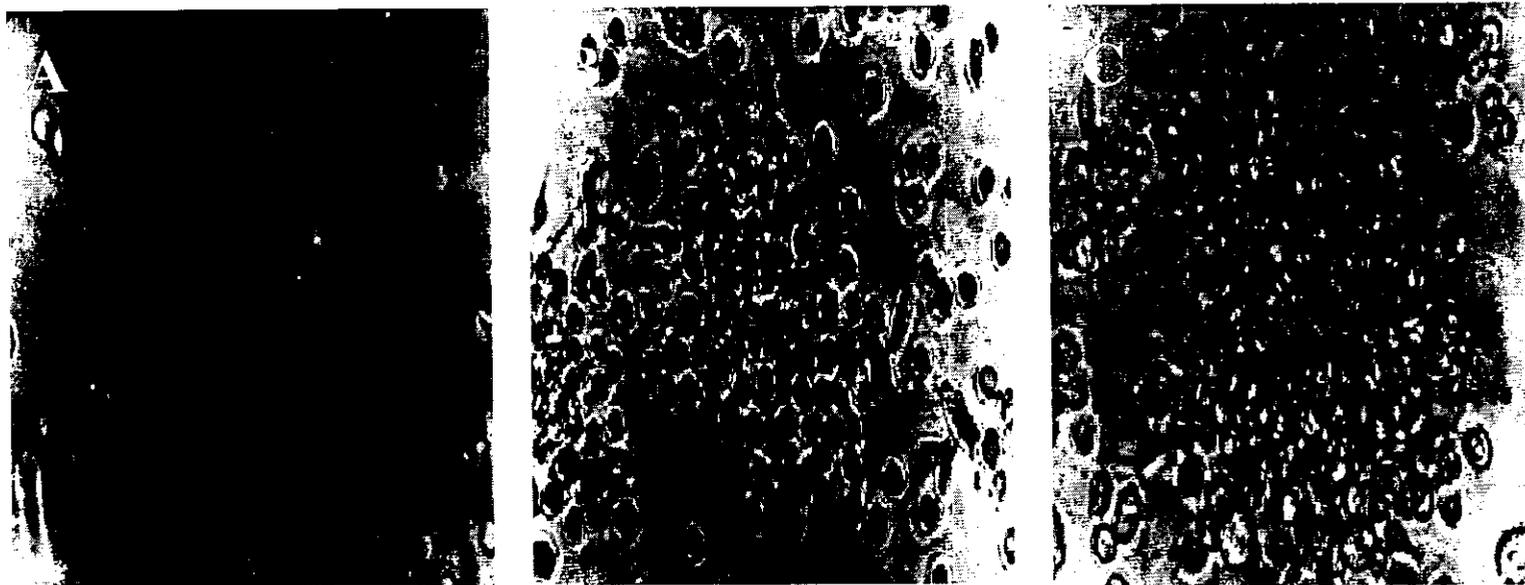


Figura 12. Diferenciación de monocitos THP-1 con ácido retinólico e IFN- γ . Monocitos THP-1 se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino(A); en RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino y ácido retinólico 1 μ M por 48 horas, y posteriormente IFN- γ 15 ng/ml por 24 (B) o 48 horas (C) adicionales.

Los macrófagos derivados de monocitos presentaron un nivel de fagocitosis de EIgG semejante al de neutrófilos y monocitos (Fig. 13 y 14). Al igual que los neutrófilos y los monocitos, los macrófagos derivados de monocitos presentaron un nivel de fagocitosis de EIgG mayor que el nivel de fagocitosis de eritrocitos no opsonizados (E) (Fig. 13 y 14). La diferencia entre el índice de fagocitosis de (E), y el índice de fagocitosis de EIgG representa la fagocitosis mediada por Fc γ Rs. A las 24 horas de diferenciación con IFN- γ , el la fagocitosis de EIgG en los macrófagos fue bloqueada sólo por el inhibidor de ERK, PD98059 (Fig. 13). Sin embargo, a las 48 horas de diferenciación con IFN- γ , la fagocitosis de EIgG en los macrófagos no sólo fue bloqueada por tratamiento con PD98059, sino también por wortmanina (Fig. 14). El quelante intracelular de calcio, MAPTAM, bloqueó la elevación de [Ca⁺²]_i inducida por entrecruzamiento de Fc γ Rs en macrófagos derivados de monocitos (Datos no mostrados), y sin embargo no tuvo efecto sobre su nivel de fagocitosis de EIgG (Fig. 13 y 14). Estos resultados indican que las enzimas PI 3-K y ERK se reclutan de forma ordenada a la maquinaria fagocítica, durante la diferenciación de monocitos a macrófagos. Primero se recluta ERK y posteriormente PI 3-K. Por otro lado, la fagocitosis mediada por Fc γ Rs en macrófagos derivados de monocitos es independiente de la elevación de [Ca⁺²]_i, al igual que en neutrófilos y monocitos.

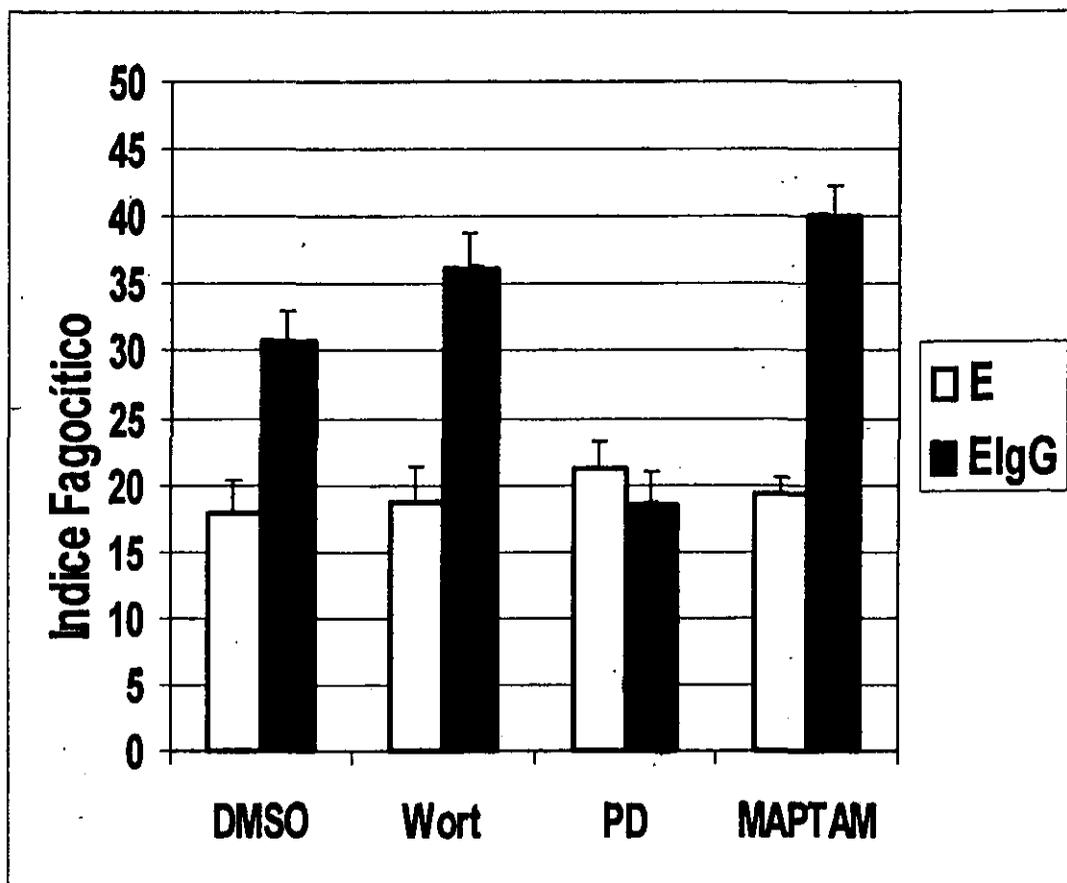


Figura 13. Macrófagos derivados de monocitos por tratamiento de 24 horas con IFN- γ sólo utilizan la enzima ERK para fagocitosis por Fc γ Rs. Células THP-1 se cultivaron con ácido retinóico 1 μ M por 48 horas, y posteriormente con IFN- γ 15 ng/ml por 24 horas adicionales. Las células diferenciadas se mezclaron con eritrocitos opsonizados con IgG y se incubaron a 37 °C por 1 hora para permitir la internalización de los eritrocitos. Las células se trataron con 50 nM wortmanina (Wort) por 30 minutos, con PD98059 30 μ M (PD) por 15 minutos, con MAPTAM 125 μ M por 45 minutos, o bien sólo con el disolvente dimetilsulfóxido (DMSO), antes de mezclarlas con los eritrocitos. Los datos se muestran como índice fagocítico (número de partículas ingeridas por 100 células). Los datos son promedio +/- error estándar de un total de seis determinaciones.

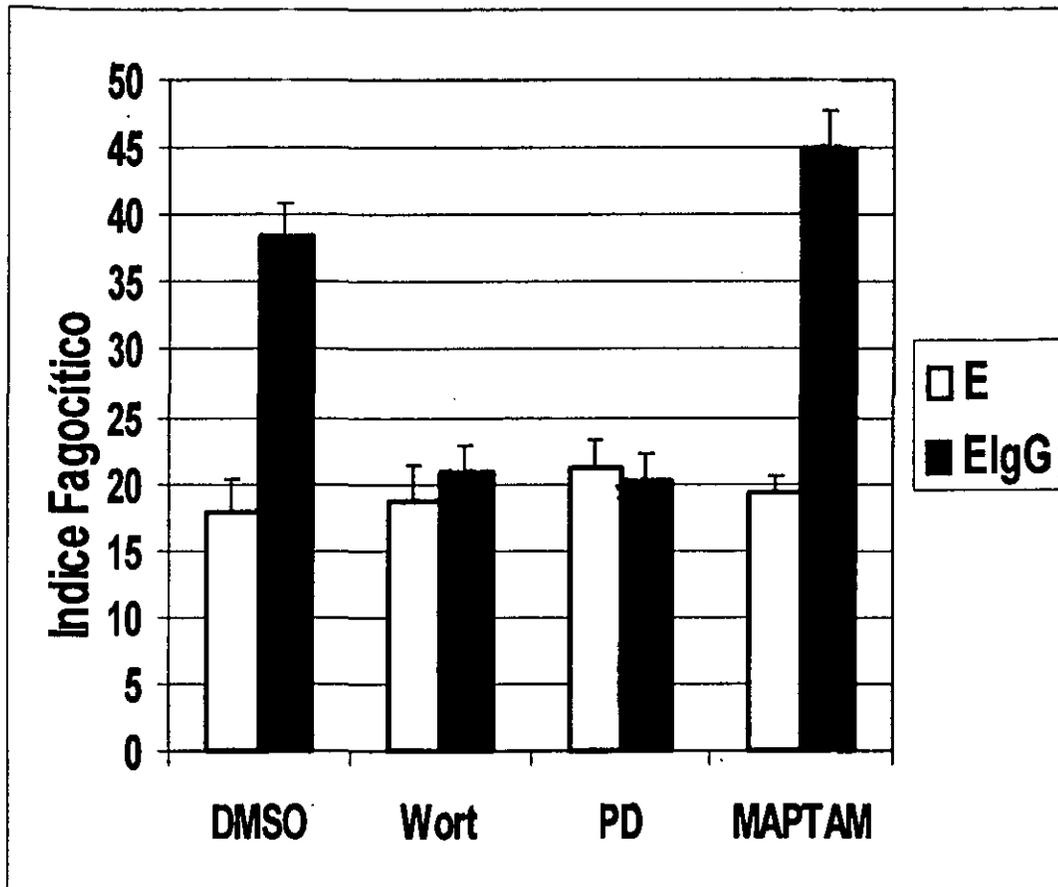


Figura 14. Tras 48 horas de diferenciación con IFN- γ , los macrófagos utilizan PI 3-K y ERK para fagocitosis por Fc γ Rs. Células THP-1 se cultivaron con ácido retinóico 1 μ M por 48 horas, y posteriormente con IFN- γ 15 ng/ml por 48 horas adicionales. Las células diferenciadas se mezclaron con eritrocitos opsonizados con IgG y se incubaron a 37 °C por 1 hora para permitir la internalización de los eritrocitos. Las células se trataron con 50 nM wortmanina (Wort) por 30 minutos, con PD98059 30 μ M (PD) por 15 minutos, con MAPTAM 125 μ M por 45 minutos, o bien sólo con el disolvente dimetilsulfóxido (DMSO), antes de mezclarlas con los eritrocitos. Los datos se muestran como índice fagocítico (número de partículas ingeridas por 100 células). Los datos son promedio +/- error estándar de un total de seis determinaciones.

V.1.4 Los neutrófilos y los macrófagos derivados de monocitos, al ser estimulados presentan niveles de fagocitosis mayores que los monocitos. En condiciones basales todos los fagocitos presentan niveles de fagocitosis relativamente bajos (15, 19, 66, 90). Sin embargo, durante el proceso de inflamación los fagocitos están expuestos a diversas sustancias que los activan (componentes bacterianos, citocinas, factores de la cascada del complemento, etc.) (14-16, 19, 66). La estimulación de los fagocitos con diversas sustancias activadoras induce respuestas celulares más intensas (15, 19, 66).

Los resultados anteriores mostraron que sólo los fagocitos profesionales (neutrófilos y macrófagos) utilizan las enzimas PI 3-K y ERK para fagocitosis por Fc γ Rs. Esta observación nos sugirió la idea de que la utilización de las enzimas PI 3-K y ERK para fagocitosis, podría involucrar una mayor eficiencia de fagocitosis estas células. Para probar esta hipótesis realizamos ensayos de fagocitosis, estimulando a las células con ésteres de fórbol. Los ésteres de fórbol se han utilizado durante mucho tiempo para estimular distintas funciones celulares en leucocitos (16). A diferencia de estimuladores como LPS o fMLP, que actúan solamente sobre algunos fagocitos, los ésteres de fórbol (como PMA) actúan sobre monocitos, macrófagos y neutrófilos. La estimulación por PMA de neutrófilos y de macrófagos (diferenciados por 48 horas con IFN- γ) indujo en estas células niveles de fagocitosis notablemente mayores a los alcanzados por monocitos estimulados en las mismas condiciones (Fig. 15). Los incrementos en índices de fagocitosis, con respecto a los ensayos de fagocitosis sin estimulación, fueron de 4 veces para neutrófilos, 3 veces para

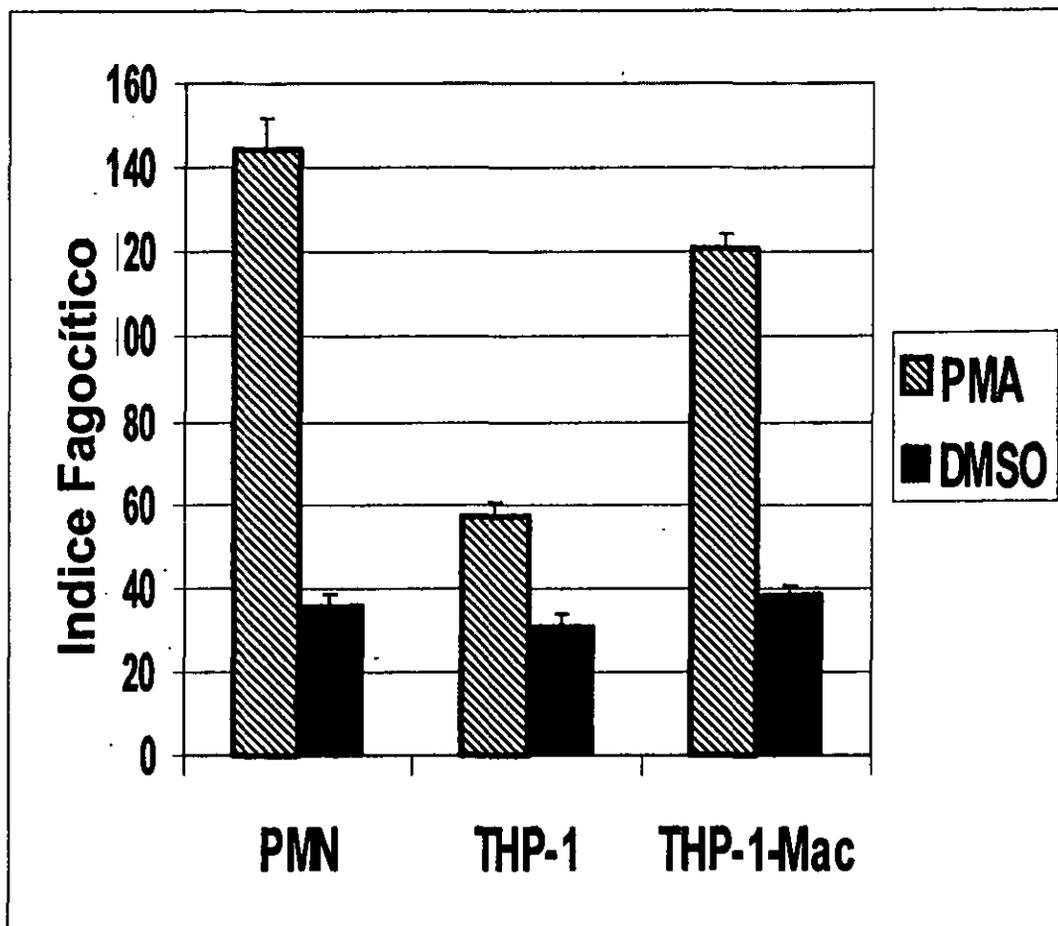


Figura 15. Bajo estimulación neutrófilos y macrófagos derivados de monocitos presentan una respuesta fagocítica intensa. Neutrófilos (PMN), monocitos (THP)-1, o macrófagos (diferenciados por 48 horas con IFN- γ) (THP-1-Mac) se trataron con 100 ng/ml PMA o sólo con el disolvente (DMSO), y se mezclaron con eritrocitos opsonizados con IgG. Las células se incubaron a 37 °C por 15 minutos (PMN) o 1 hora (THP-1 y THP-1-Mac) para permitir la internalización de los eritrocitos. Los datos se expresan como índice fagocítico (número de partículas ingeridas por 100 células). Los datos son promedio +/- error estándar de un total de seis determinaciones

macrófagos y 2 veces para monocitos (Fig. 15). Estos resultados sugieren que la utilización de PI 3-K y de ERK para fagocitosis por FcγRs puede efectivamente resultar en una mayor eficiencia del proceso de fagocitosis en los fagocitos profesionales.

Se ha reportado, sin embargo, que el juego de enzimas que participa en una determinada respuesta celular puede cambiar, dependiendo de las condiciones de activación de algunos leucocitos (39, 91-93). Por esta razón decidimos confirmar que la mayor eficiencia de fagocitosis observada en neutrófilos y en macrófagos estimulados con PMA, efectivamente involucraba la participación tanto de PI 3-K como de ERK. El inhibidor de ERK, PD98059, redujo notablemente el nivel de fagocitosis de EIgG en macrófagos y neutrófilos estimulados con PMA (Fig. 16 y 17). La wortmanina sin embargo, no tuvo efecto sobre el nivel de fagocitosis de EIgG en macrófagos o monocitos estimulados (Fig. 16 y 17). En monocitos, la fagocitosis estimulada con PMA fue independiente tanto de PI 3-K, como de ERK (Fig. 18). Los resultados anteriores sugieren que al menos la utilización de ERK puede hacer más eficiente la respuesta fagocítica de los fagocitos profesionales (i.e. neutrófilos y macrófagos). Por otro lado, se sabe que algunas isoformas de PKC son activadas por los productos de la actividad enzimática de PI 3-K (47, 55, 62, 94). Los ésteres de fórbol por su parte son también activadores de las enzimas de la familia PKC. Por lo tanto existe la posibilidad de que, al estimular directamente PKC con PMA, la inhibición de PI 3-K por wortmanina no tenga efecto sobre la actividad fagocítica de neutrófilos y macrófagos (Fig. 16 y 17). Estos resultados sugieren que, en la vía de señalización que regula la fagocitosis por FcγRs en neutrófilos y macrófagos, la actividad de PI 3-K es necesaria para la activación de PKC.

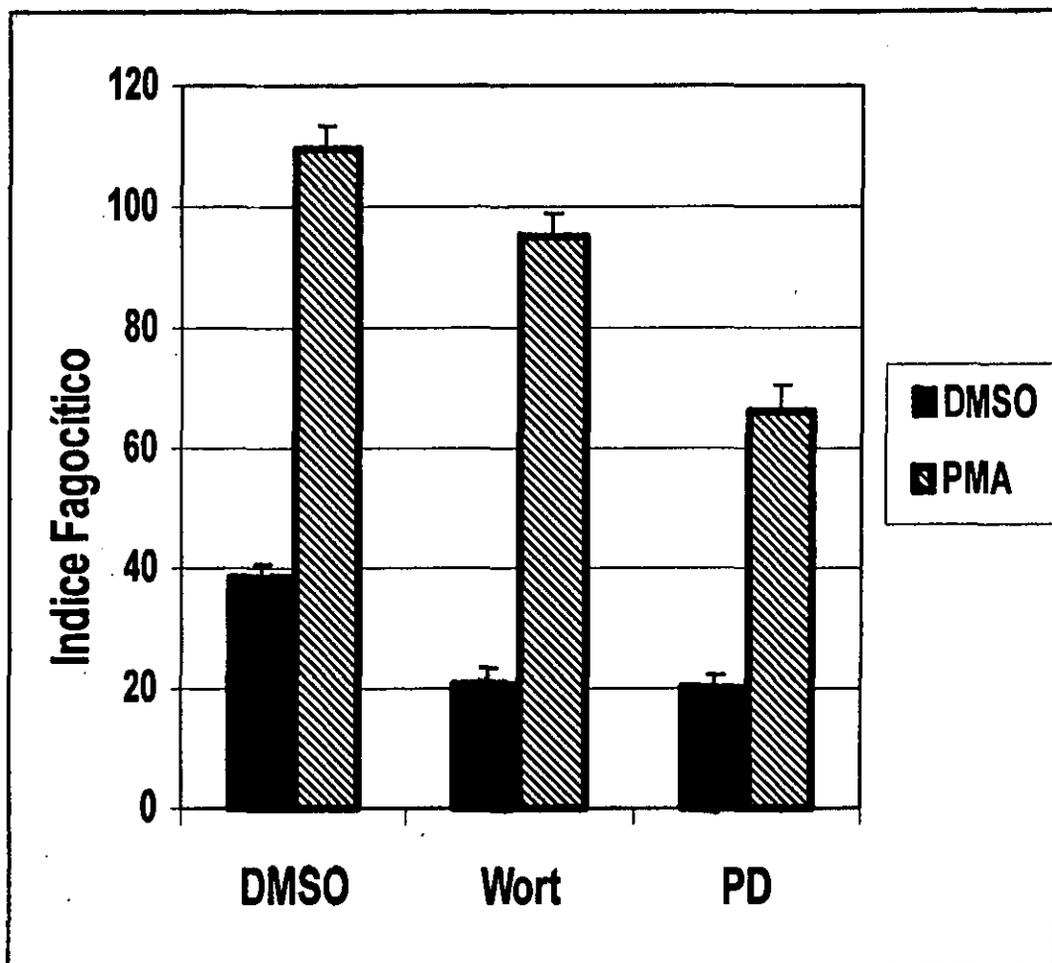


Figura 16. La fagocitosis de EIGG, en neutrófilos estimulados con PMA depende de ERK. Los neutrófilos se trataron con 100 ng/ml PMA o sólo con el disolvente dimetilsulfóxido (DMSO) y se mezclaron con eritrocitos opsonizados con IgG (EIGG). Las células se incubaron a 37 °C por 1 hora para permitir la internalización de los eritrocitos. Los monocitos se trataron con wortmanina (Wort) 50 nM por 30 minutos, PD98059 (PD) 30 μ M por 15 minutos o bien sólo el disolvente (DMSO), antes de mezclarlos con los eritrocitos. Los datos se expresan como índice fagocítico (número de partículas ingeridas por 100 células). Los datos son promedio \pm error estándar de un total de seis determinaciones.

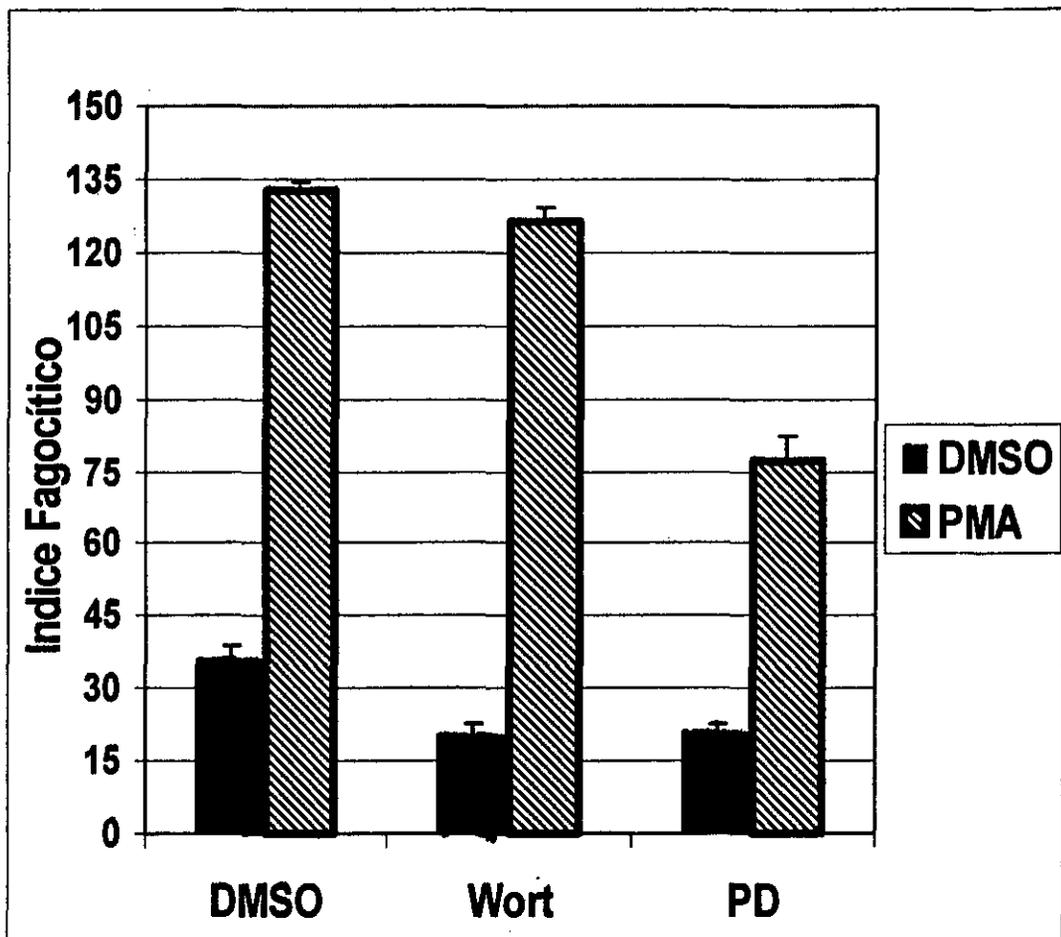


Figura 17. La fagocitosis de EIgG, en macrófagos estimulados con PMA depende de ERK. Los macrófagos (diferenciados por 48 horas con IFN- γ) se trataron con 100 ng/ml PMA o sólo con el disolvente dimetilsulfóxido (DMSO) y se mezclaron con eritrocitos opsonizados con IgG (EIgG). Las células se incubaron a 37 °C por 1 hora para permitir la internalización de los eritrocitos. Los monocitos se trataron con wortmanina (Wort) 50 nM por 30 minutos, PD98059 (PD) 30 μ M por 15 minutos o bien sólo el disolvente (DMSO), antes de mezclarlos con los eritrocitos. Los datos se expresan como índice fagocítico (número de partículas ingeridas por 100 células). Los datos son promedio \pm error estándar de un total de seis determinaciones.

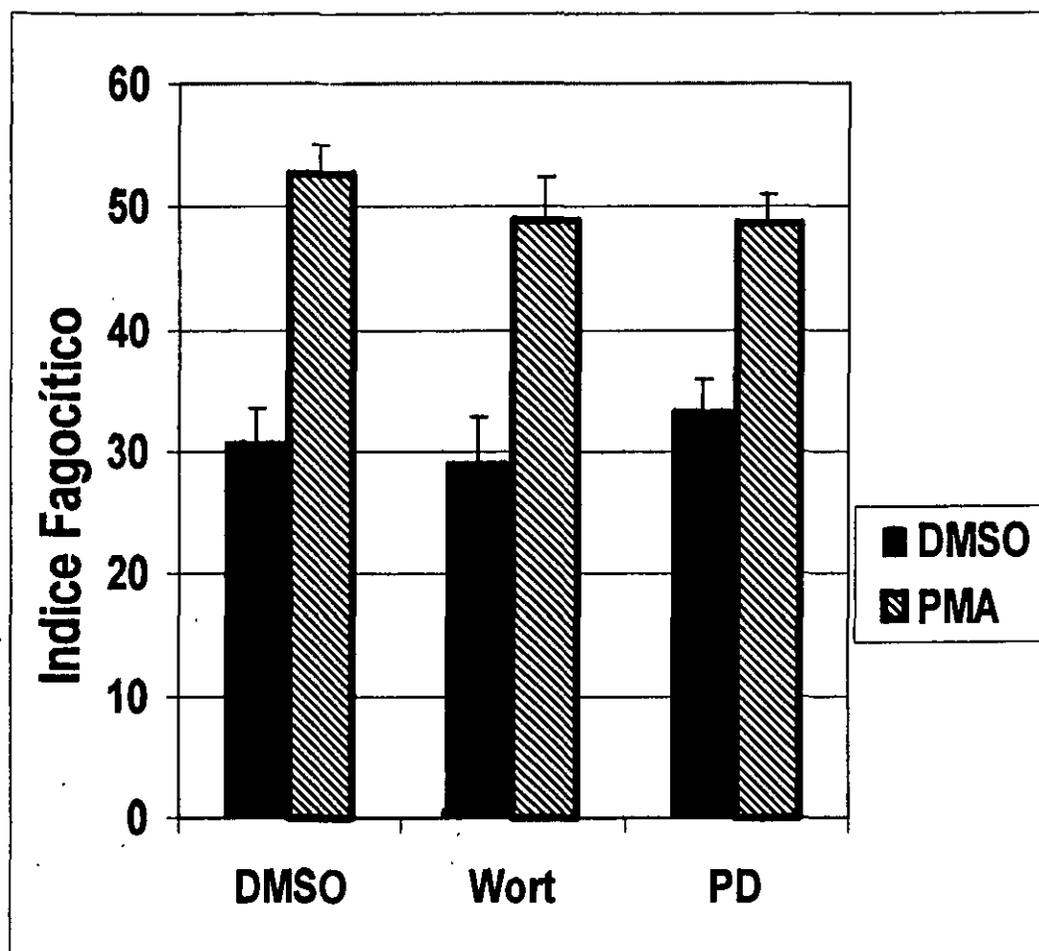


Figura 18. La fagocitosis de EIgG en monocitos estimulados con PMA es independiente de ERK y PI 3-K. Monocitos THP-1 se trataron con 100 ng/ml PMA o sólo con el disolvente dimetilsulfóxido (DMSO) y se mezclaron con eritrocitos opsonizados con IgG. Las células se incubaron a 37 °C por 1 hora para permitir la internalización de los eritrocitos. Los monocitos se trataron con wortmanina (Wort) 50 nM por 30 minutos, PD98059 (PD) 30 μ M por 15 minutos o bien sólo el disolvente (DMSO), antes de mezclarlos con los eritrocitos. Los datos se expresan como índice fagocítico (número de partículas ingeridas por 100 células). Los datos son promedio \pm error estándar de un total de seis determinaciones.

V.2 Medición de fagocitosis por citometría de flujo y aplicación de esta técnica a estudios de señalización intracelular.

V.2.1 Marcado de eritrocitos de carnero con dextrán fluoresceinado. En 1989 se describió un protocolo de diálisis hipotónica de eritrocitos, que permite introducir una variedad de moléculas al citoplasma de estas células (86). Este protocolo consiste en la ruptura parcial de la membrana plasmática por diálisis hipotónica. Los eritrocitos se colocan dentro una membrana de diálisis, junto con el compuesto que se desea introducir a su citoplasma. A la diálisis hipotónica le sigue una diálisis en condiciones isotónicas a 37 °C, que permite que la membrana celular se selle. De esta forma el compuesto de interés queda atrapado dentro del citoplasma. Con este protocolo se induce la introducción de dextrán fluoresceinado al citoplasma de los eritrocitos. La marca fluorescente dentro de las células puede ser detectada entonces por citometría de flujo (CMF) (Fig. 19). Es importante notar que la marca fluorescente se detecta prácticamente en el total de los eritrocitos (Fig. 19), por lo que este procedimiento constituye un método de marcado fluorescente muy eficiente para estas células.

V.2.2 Detección de fagocitosis por citometría de flujo en neutrófilos y monocitos. Los ensayos de fagocitosis tradicionales implican el análisis microscópico de las células, para evaluar en número de partículas ingeridas por cada célula. Este es un procedimiento que, aunque preciso y muy confiable, toma mucho tiempo y resulta tedioso (70, 71). Aunque se han reportado algunos métodos para medir fagocitosis por CMF, ninguno de estos métodos parece ser aplicable a más de un tipo celular (71, 75-77).

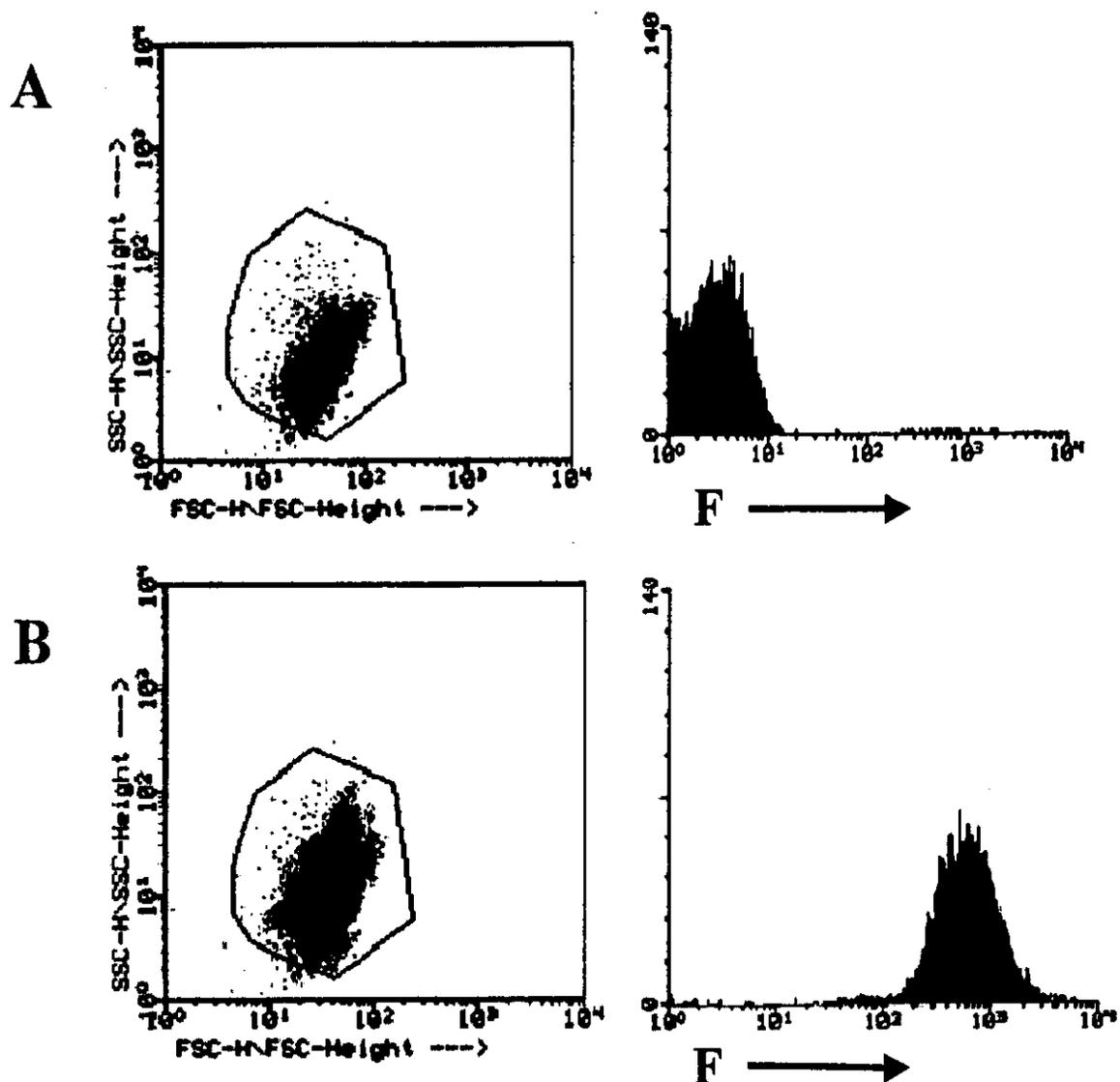


Figura 19. Marcado de eritrocitos con dextrán fluoresceinado. Eritrocitos de carnero se cargaron con dextrán fluoresceinado y se analizaron por citometría de flujo. A) Dot-plot e histograma de fluorescencia de la población de eritrocitos sin marca. B) Dot-plot e histograma de fluorescencia de la población de eritrocitos marcados con dextrán fluoresceinado. F, fluorescencia.

Utilizamos eritrocitos fluorescentes como blancos de fagocitosis para ensayos de fagocitosis con neutrófilos y monocitos, esperando que la marca fluorescente en los eritrocitos pudiera detectarse por CMF en las poblaciones de fagocitos. En general diferentes tipos celulares poseen propiedades de tamaño y granularidad característicos que los distinguen de otros tipos celulares. Ambas propiedades pueden ser analizadas por CMF, de forma que es posible analizar tipos celulares particulares dentro de una mezcla con dos o más tipos de células. Para el análisis de fagocitosis por CMF era necesario analizar la población de fagocitos de manera aislada, y detectar sólo los cambios de fluorescencia en estas poblaciones. El cambio en la fluorescencia de la población de fagocitos debía entonces darnos un estimado del nivel de ingestión de eritrocitos fluorescentes. Con el fin de determinar si era posible analizar por CMF la población de fagocitos de manera aislada, aún dentro de una mezcla con eritrocitos, se hizo un análisis de eritrocitos y de fagocitosis aislados, así como de mezclas de ambos. Se analizaron dos tipos de fagocitos: neutrófilos humanos purificados de sangre periférica y monocitos de la línea celular humana THP-1. El análisis tipo dot-plot de las mezclas de fagocitos (neutrófilos y monocitos) y eritrocitos (Fig. 20) indicó que las poblaciones de fagocitos podían ser analizadas de forma independiente, sin interferencia de la población de eritrocitos. La identidad de la población de eritrocitos se confirmó por inmunotinción con anticuerpos anti eritrocitos de carnero (Fig. 20A). La identidad de las poblaciones de neutrófilos (Fig. 20B) y monocitos (Fig. 20C) se confirmó por inmunotinción con anticuerpos contra la cadena $\beta 2$ de integrinas. Esta subunidad de las integrinas se encuentra exclusivamente en leucocitos, por lo que representa un buen marcador para identificar células como neutrófilos y monocitos (95, 96).

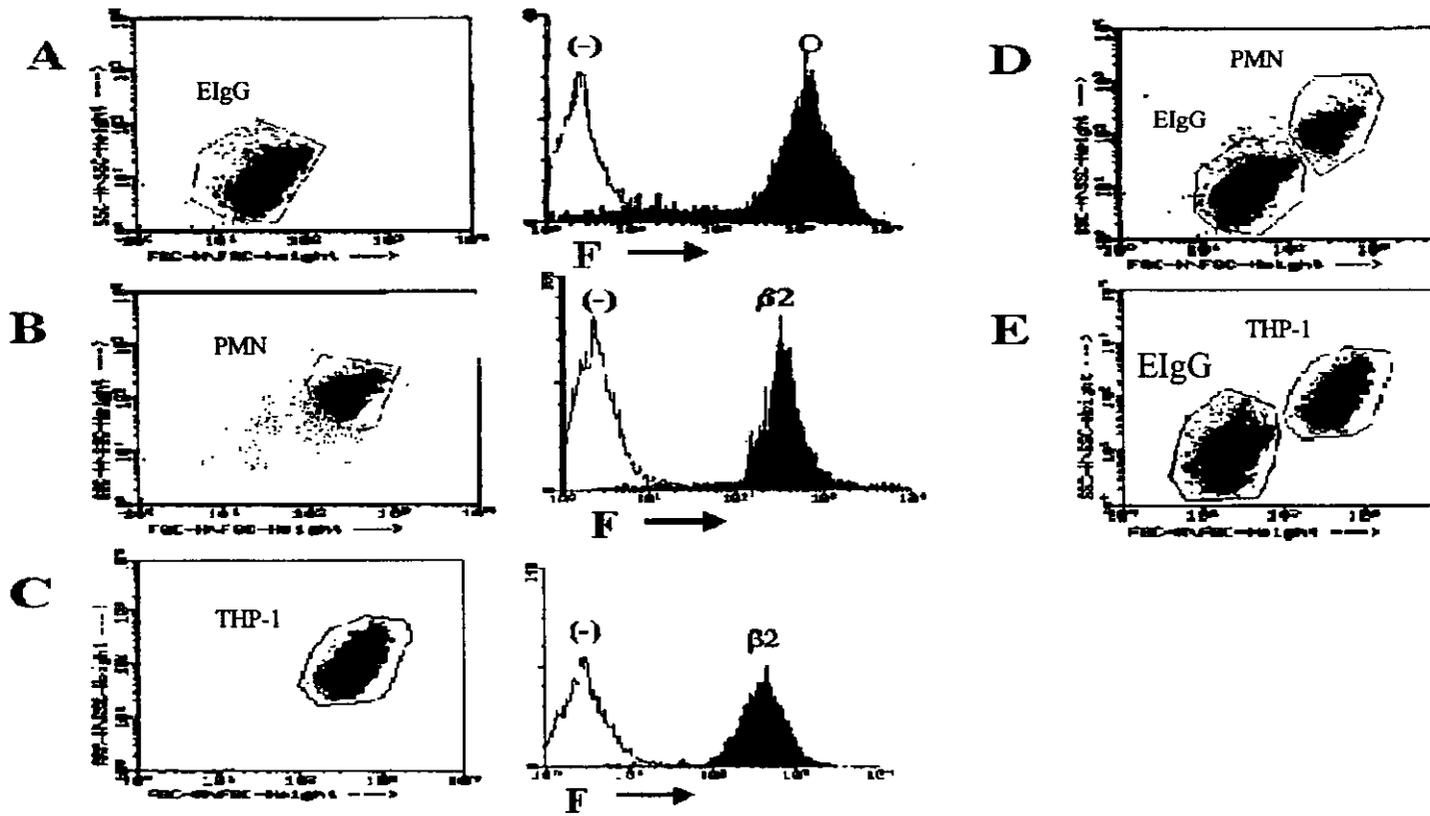


Figura 20. Fagocitos y eritrocitos aparecen como poblaciones independientes en un análisis tipo dot-plot. A) Dot-plot e histograma de fluorescencia de la población de eritrocitos opsonizados con IgG (EIgG). Los eritrocitos se marcaron con anticuerpos contra IgG (O). B-C) Dot-plot e histogramas de fluorescencia de las poblaciones de neutrófilos (PMN) (B) o monocitos (THP1) (C), marcados con anticuerpos contra la cadena β_2 de las integrinas (β_2). La fluorescencia basal se ajustó utilizando células sin marca (-). D-E) Dot-plot de EIgG y PMN (C) y de EIgG y THP-1 (D) mezclados. F: fluorescencia.

A continuación analizamos la fluorescencia en las poblaciones de neutrófilos y de monocitos después de ensayos de fagocitosis con eritrocitos fluorescentes opsonizados con IgG (F-EIgG). Para los ensayos de fagocitosis iniciales decidimos estimular a los fagocitos con ésteres de fórbol (PMA), a fin de obtener una respuesta fagocítica intensa, que fuera fácilmente detectable. Los neutrófilos presentaron un aumento de fluorescencia después de fagocitar F-EIgG (Fig. 21B). Este aumento de fluorescencia no se observó cuando se utilizaron eritrocitos no fluorescentes opsonizados con IgG, como blancos de fagocitosis (Fig. 21C). De igual forma los monocitos presentaron un aumento de fluorescencia después de fagocitar F-EIgG (Fig. 22B). Este aumento de fluorescencia tampoco se observó cuando se utilizaron eritrocitos no fluorescentes opsonizados como blancos de fagocitosis (Fig. 22C).

Para determinar si era posible detectar por CMF respuestas fagocíticas menos intensas, evaluamos la fluorescencia en las poblaciones de neutrófilos y de monocitos, después de ensayos de fagocitosis no estimulada. La población de neutrófilos presentó aproximadamente 9 % de células fluorescentes, en ensayos de fagocitosis de F-EIgG sin estimulación (Fig. 23A). En ensayos de fagocitosis de F-EIgG, estimulada con PMA la población de neutrófilos presentó aproximadamente 28 % de células fluorescentes (Fig. 23B). De forma similar, la población de monocitos presentó aproximadamente 43 % de células fluorescentes en ensayos de fagocitosis de F-EIgG sin estimulación (Fig. 23C). Los monocitos estimulados con PMA presentaron aproximadamente 70 % de células fluorescentes (Fig. 23D). Estos resultados indican que nuestro método de análisis permite detectar fagocitosis por neutrófilos y monocitos, aún si las células no son estimuladas y la respuesta fagocítica es modesta.

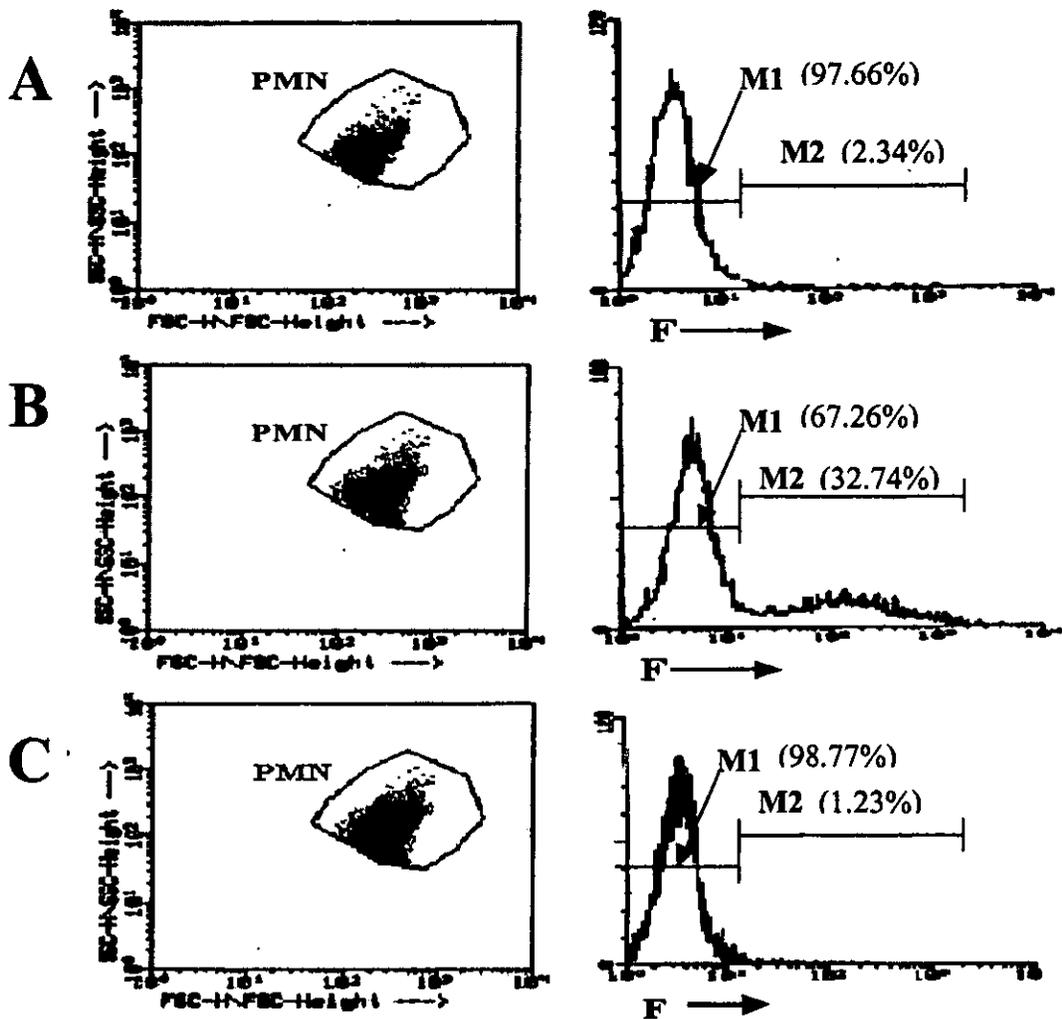


Figura 21. Los neutrófilos presentan un aumento de fluorescencia después de fagocitar F-EIgG. A) Dot-plot e histograma de fluorescencia de la población de neutrófilos (PMN) solos. B) Dot-plot e histograma de fluorescencia de la población de PMN después de un ensayo de fagocitosis con F-EIgG. C) Dot-plot e histograma de fluorescencia de la población de PMN después de un ensayo de fagocitosis con eritrocitos no fluorescentes. En A y en B las células se estimularon con PMA a 100 ng/ml. La fluorescencia basal se ajustó utilizando PMN solos. M1 corresponde a los eventos negativos. M2 corresponde a los eventos positivos. M1 y M2 se expresan como porcentajes de la población total. Para este análisis se capturaron únicamente los eventos correspondientes a la región de PMN. F: fluorescencia.

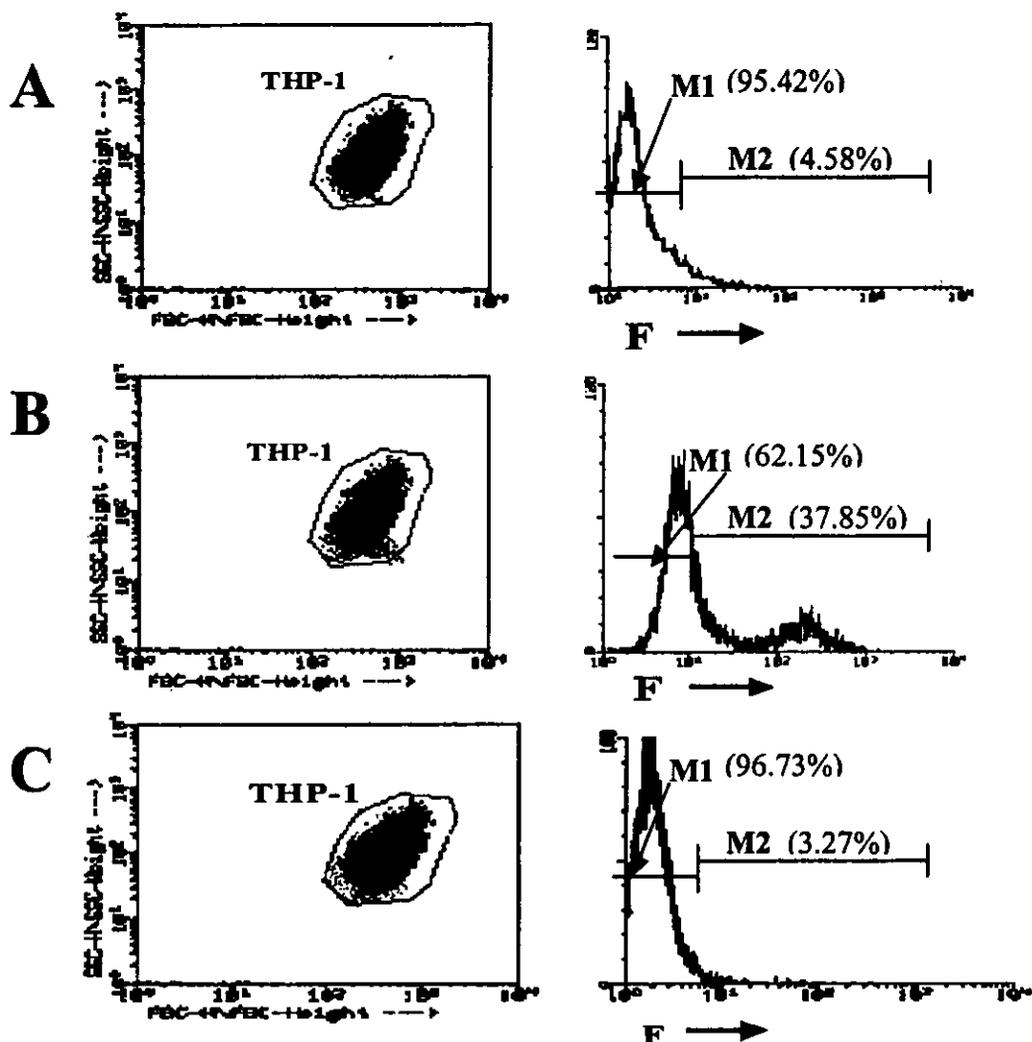


Figura 22. Los monocitos presentan un aumento de fluorescencia después de fagocitar F-EIgG. A) Dot-plot e histograma de fluorescencia de la población de monocitos (THP-1) solos. B) Dot-plot e histograma de fluorescencia de la población de THP-1 después de un ensayo de fagocitosis con F-EIgG. C) Dot-plot e histograma de fluorescencia de la población de THP-1 después de un ensayo de fagocitosis con eritrocitos no fluorescentes. En A y B las células se estimularon con PMA a 100 ng/ml. La fluorescencia basal se ajustó utilizando THP-1 solos. M1 corresponde a los eventos negativos. M2 corresponde a los eventos positivos. M1 y M2 se expresan como porcentajes de la población total. Para este análisis se capturaron únicamente los eventos correspondientes la región de THP-1. F: fluorescencia.

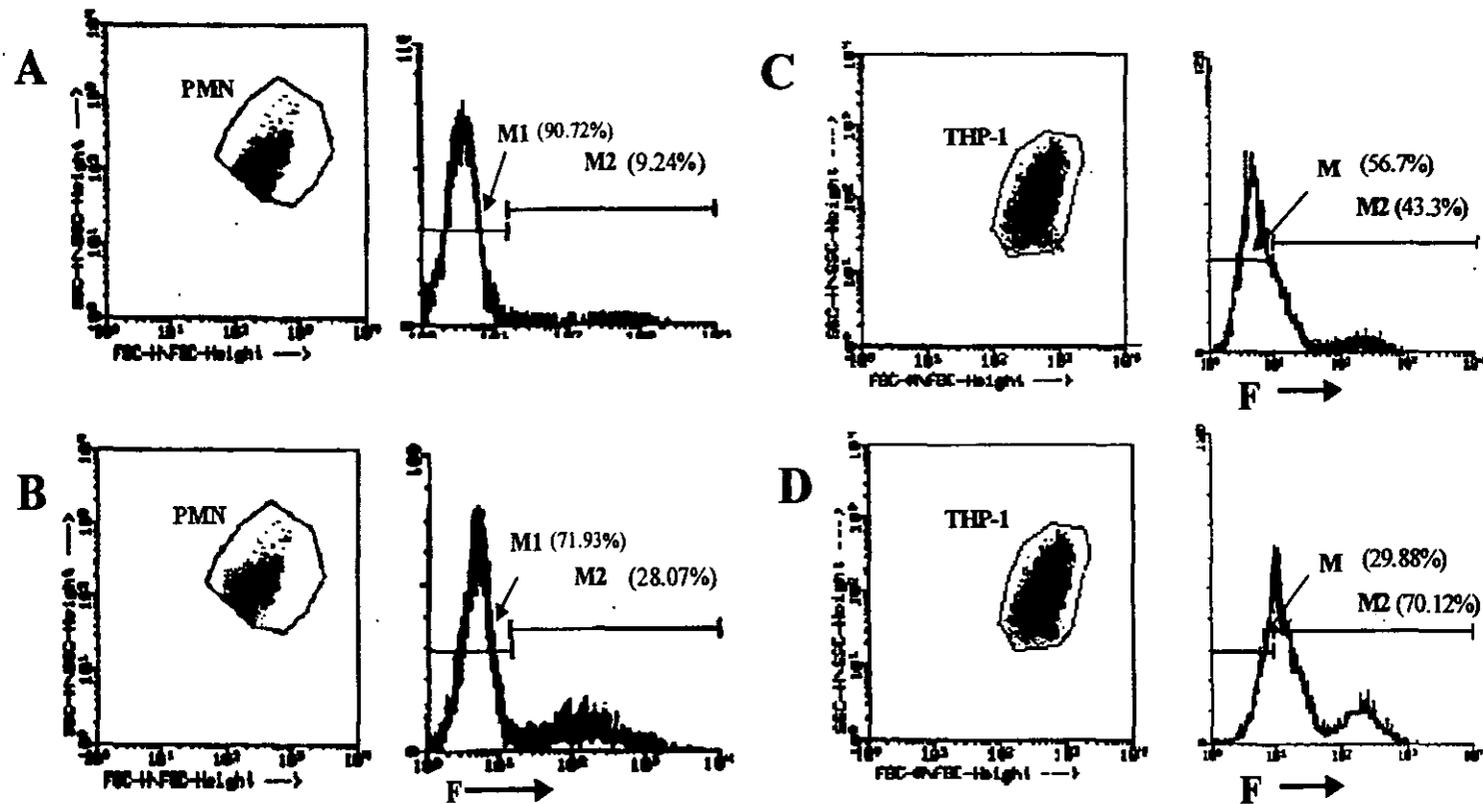


Figura 23. La proporción de fagocitos fluorescentes aumenta cuando éstos son estimulados con PMA. Ensayos de fagocitosis de F-EIgG por neutrófilos (A-B) y monocitos (C-D). A y C son ensayos de fagocitosis no estimulada. En B y D los fagocitos se estimularon con PMA a 100 ng/ml. La fluorescencia basal se ajustó utilizando fagocitos solos. M1 corresponde a los eventos negativos. M2 corresponde a los eventos positivos. M1 y M2 se expresan como porcentajes de la población total. Para el análisis se capturaron únicamente los eventos correspondientes las regiones de neutrófilos y monocitos. F: fluorescencia.

El análisis de fagocitosis por microscopía de luz permite detectar cambios graduales en los niveles de fagocitosis, inducidos por el tratamiento de los fagocitos con distintos estimuladores, como los ésteres de fórbol (PMA). A continuación decidimos evaluar la capacidad de nuestro análisis de fagocitosis por CMF para detectar pequeños cambios en los niveles de fagocitosis, inducidos por el tratamiento de los fagocitos con distintas concentraciones de PMA. Concentraciones crecientes de PMA resultaron en un aumento gradual de la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG, tanto en neutrófilos (Fig. 24) como en monocitos (Fig. 29). Las curvas dosis - respuesta de fagocitosis, obtenidas analizando el porcentaje de células fluorescentes en las poblaciones de fagocitos por CMF, fueron muy similares a las curvas dosis - respuesta obtenidas a través del análisis tradicional de fagocitosis por microscopía de luz. El coeficiente de correlación (r) para las curvas dosis- respuesta de fagocitosis, obtenidas por CMF y por microscopía de luz, fue de 0.96 para neutrófilos y de 0.99 para monocitos. Estos resultados indican que nuestro método de análisis de fagocitosis por CMF es, efectivamente, sensible a cambios sutiles en los niveles de fagocitosis, inducidos por la estimulación de los fagocitos. Estos cambios son además comparables a los cambios que se detectan por microscopía de luz. Es importante señalar que nuestro método de análisis de fagocitosis por CMF no refleja en realidad la capacidad fagocítica que unas células tienen con respecto a las otras. Se sabe que en general los monocitos presentan niveles más bajos de fagocitosis que los neutrófilos o los macrófagos (3, 14, 65, 66). No obstante, en el análisis de fagocitosis por CMF el porcentaje de células fluorescentes en la población de monocitos es mayor que en la población de neutrófilos (Fig. 23). Esta observación sin embargo no invalida nuestro método de análisis de fagocitosis por CMF, puesto que los cambios en los niveles de fagocitosis de neutrófilos

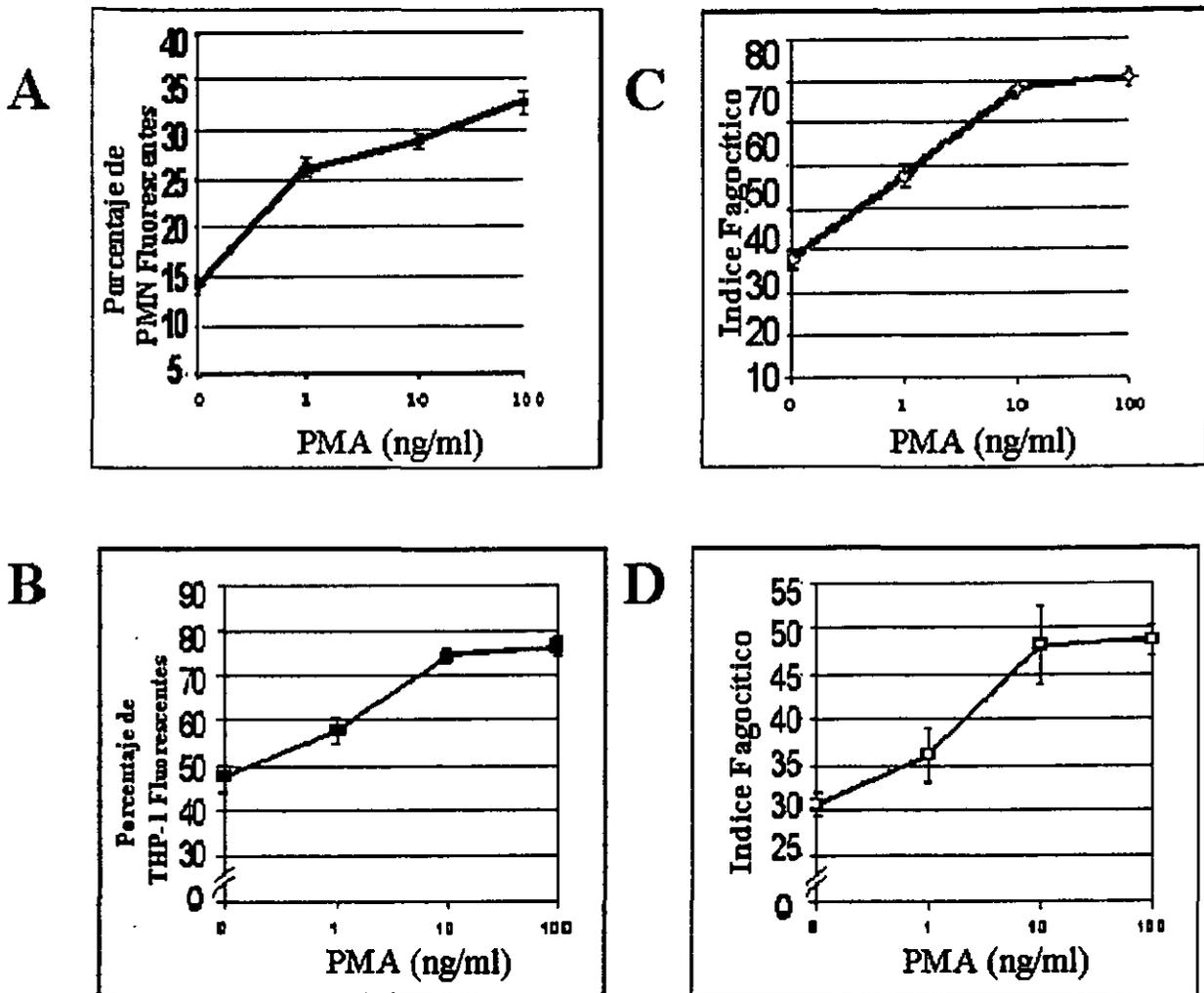


Figura 24. La citometría de flujo permite detectar cambios graduales en los niveles de fagocitosis cuando los fagocitos son estimulados. Los neutrófilos (A y C) y los monocitos (B y D) se estimularon con concentraciones crecientes de PMA. A-B) Fagocitosis de eritrocitos fluorescentes opsonizados con IgG, analizada por CMF. Los datos se expresan como porcentaje de células fluorescentes en la población de neutrófilos. Los datos son promedio \pm error estándar de 4 determinaciones. C-D) Fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG, analizada por microscopía de luz. Los resultados se expresan como índice fagocítico (número de partículas ingeridas por 100 células). Los datos son promedio \pm error estándar de 3 determinaciones.

o de monocitos se evalúan con respecto al mismo tipo celular en diferentes condiciones (Fig. 24). Aunque desconocemos la razón de la discrepancia entre el porcentaje de células fluorescentes y la capacidad fagocítica real de monocitos y neutrófilos, una posible explicación se relaciona con las diferencias de fluorescencia basal de las células (ver sección de discusión).

V.2.3 Evaluación por citometría de flujo de cambios en los niveles de fagocitosis, en presencia de inhibidores farmacológicos. A continuación quisimos evaluar la posible aplicación de nuestro método de análisis de fagocitosis por CMF para el estudio de los eventos de señalización intracelular que regulan en proceso de fagocitosis. Para utilizamos los inhibidores farmacológicos wortmanina, PD98059 y citocalasina B (CytB), para evaluar su efecto sobre el nivel de fagocitosis de F-EIgG en neutrófilos en monocitos.

El análisis de fagocitosis por microscopía de luz nos permitió detectar cambios en los niveles de fagocitosis en neutrófilos, cuando éstos se trataron con inhibidores de PI 3-K y de ERK (Fig.9). Decidimos evaluar si nuestro método de análisis de fagocitosis por CMF nos permitiría obtener resultados semejantes a los obtenidos por microscopía de luz. La inhibición de PI 3-K por wortmanina en neutrófilos nos permitió registrar por CMF una reducción del nivel de fagocitosis de EIgG (Fig. 25A), que es muy similar a la que se registró por microscopía de luz (Fig. 9 y 25B). De igual forma, la inhibición de ERK por PD98059 nos permitió registrar por CMF una reducción del nivel de fagocitosis de EIgG (Fig. 25A) muy similar a la que se registró por microscopía de luz (Fig. 9 y 25B).

La inhibición de ERK por PD9805 no tuvo efecto sobre el nivel de fagocitosis de EIgG registrado por CMF en monocitos (Fig. 26A). Estos resultados concuerdan con lo que

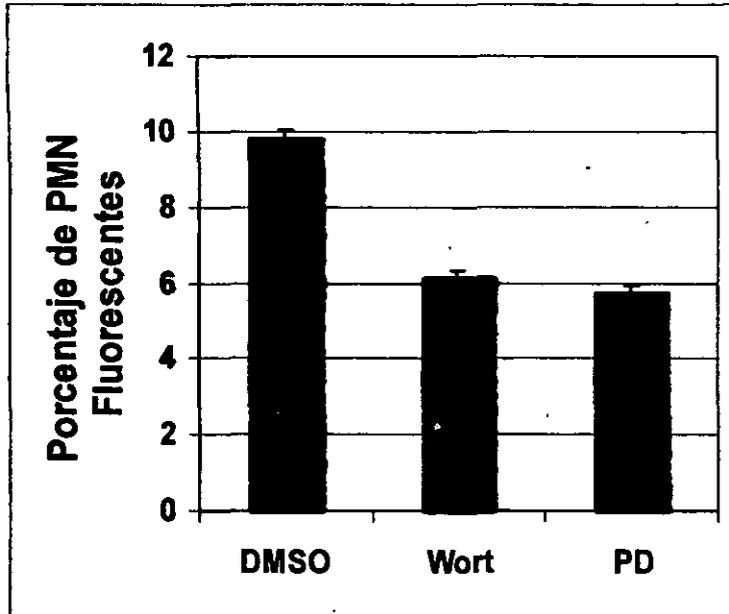
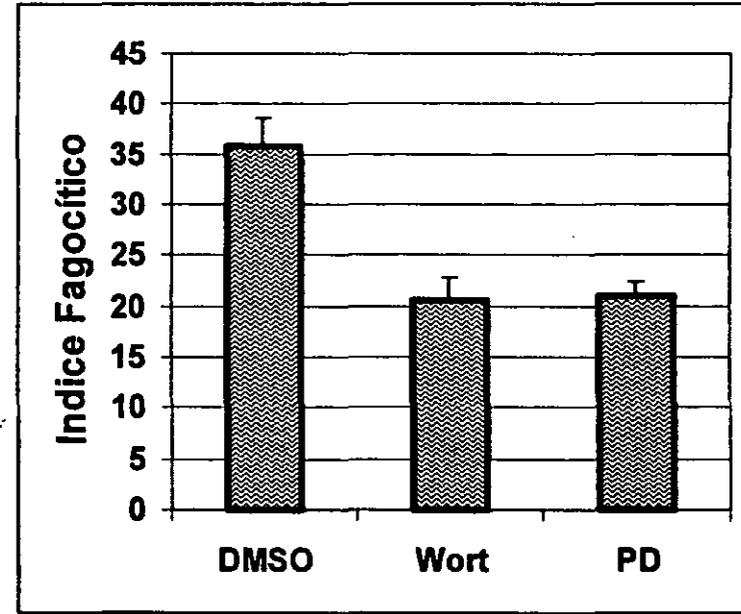
A**B**

Figura 25. La citometría de flujo permite detectar cambios en los niveles de fagocitosis cuando los neutrófilos son tratados con **inhibidores farmacológicos**. Los neutrófilos (PMN) se trataron con 50 nM wortmanina por 30 minutos, con 30 μ M PD98059 por 15 minutos, o bien sólo con el disolvente dimetilsulfóxido (DMSO), antes de mezclarlos con los eritrocitos. A) Fagocitosis de eritrocitos fluorescentes opsonizados con IgG, analizada por CMF. Los datos se expresan como porcentaje de células fluorescentes en la población de neutrófilos. Los datos son promedio \pm error estándar de 4 determinaciones. B) Fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG, analizada por microscopía de luz. Los resultados se expresan como índice fagocítico (número de partículas ingeridas por 100 células). Los datos son promedio \pm error estándar de 6 determinaciones.

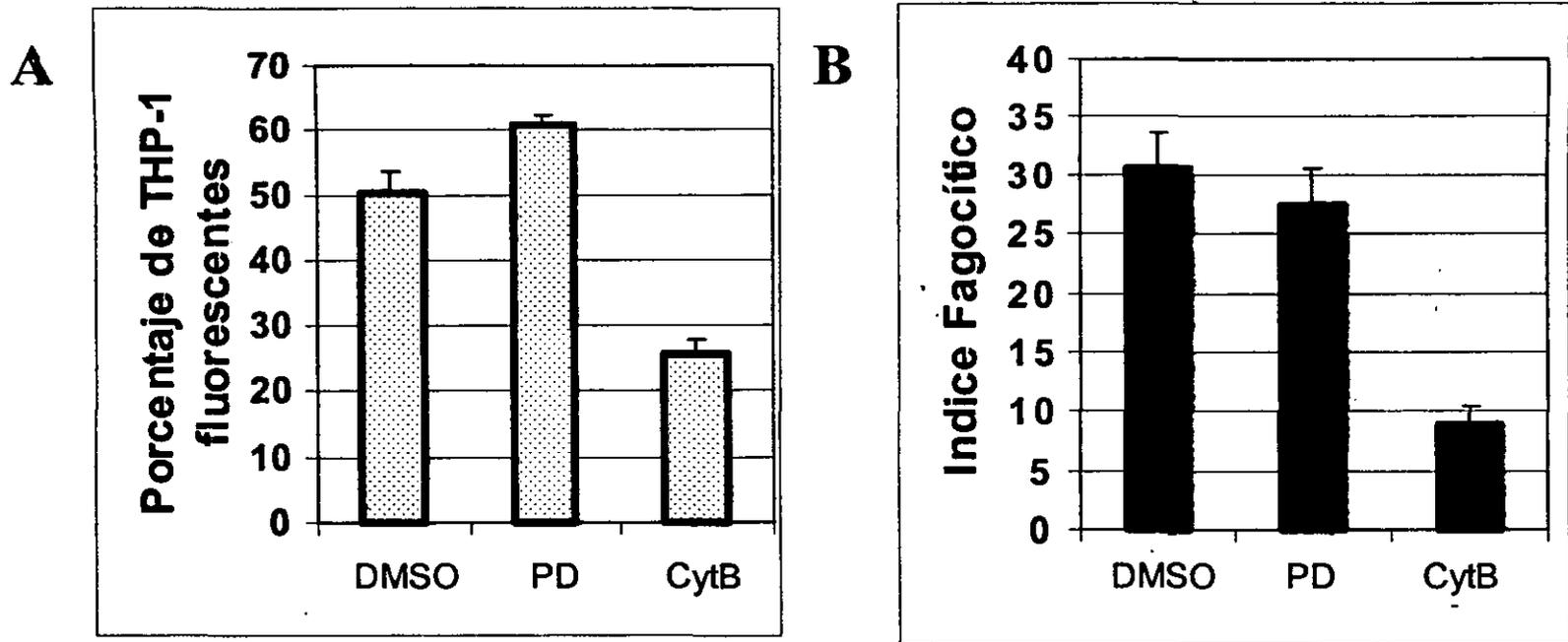


Figura 26. La citometría de flujo permite detectar cambios en los niveles de fagocitosis cuando los monocitos son tratados con inhibidores farmacológicos. Los monocitos (THP-1) se trataron con 10 μ M citocalasina B por 15 minutos, con 30 μ M PD98059 por 15 minutos, o bien sólo con el disolvente dimetilsulfóxido (DMSO), antes de mezclarlos con los eritrocitos. A) Fagocitosis de eritrocitos fluorescentes opsonizados con IgG, analizada por CMF. Los datos se expresan como porcentaje de células fluorescentes en la población de monocitos. Los datos son promedio \pm error estándar de 4 determinaciones. B) Fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG, analizada por microscopía de luz. Los resultados se expresan como índice fagocítico (número de partículas ingeridas por 100 células). Los datos son promedio \pm error estándar de 6 determinaciones.

observamos en monocitos por microscopía de luz (Fig. 11 y 26B). Por otra parte, el reordenamiento del citoesqueleto de actina es fundamental para el desarrollo del proceso de fagocitosis. Fármacos como la citocalasina B (CytB), que interfieren con el reordenamiento del citoesqueleto de actina, son por lo tanto capaces de inhibir la fagocitosis (15, 16). El tratamiento de monocitos con CytB redujo notablemente su nivel de fagocitosis de EIgG. Esta reducción se observó tanto por CMF (Fig. 26A), como por microscopía de luz (Fig. 26B). Estos resultados muestran que nuestro método de análisis de fagocitosis por CMF es capaz de detectar cambios en los niveles de fagocitosis, inducidos por diferentes inhibidores farmacológicos, en distintos tipos de leucocitos.

VI. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN.

VI.1 Reclutamiento de PI 3-K y ERK para fagocitosis por FcγRs durante la diferenciación de monocitos.

El proceso de fagocitosis es un elemento crítico dentro del sistema inmunológico. La fagocitosis no es sólo el mecanismo por medio del cual la mayoría de los agentes patógenos son destruidos, sino que además es esencial para la activación de los mecanismos del sistema inmunológico específico, a partir de la presentación de antígenos a los linfocitos T, y juega un papel determinante en la reparación de los tejidos dañados y en la recuperación de la homeostasis (3, 14, 15). Aunque el proceso de fagocitosis se conoce desde hace mucho tiempo, los mecanismos moleculares que lo regulan sólo se conocen parcialmente (1, 24, 25). Debido a la importancia del proceso de fagocitosis dentro del sistema inmunológico existe actualmente gran interés por identificar los componentes moleculares que regulan la fagocitosis en los distintos fagocitos del sistema inmunológico (1, 24, 25, 30).

Los distintos tipos de receptores Fcγ poseen diferentes grados de afinidad para las diferentes subclases de IgG (3, 4). La diferencia en la afinidad relativa de los receptores Fcγ por las distintas subclases de IgG está relacionada con la estructura de la porción extracelular de los receptores (1, 4). De esta forma, la interacción de una subclase particular de IgG con células del sistema inmunológico podría favorecer la señalización intracelular a través de un tipo particular de receptor Fcγ. Aunque los distintos tipos de FcγR pueden utilizar vías de señalización distintas para generar una determinada respuesta celular (4, 18,

20), *in vivo* las respuestas celulares mediadas por FcγRs se llevan a cabo a través de la interacción de distintas subclases de IgG con los diferentes tipos de receptores Fcγ sobre las células del sistema inmunológico (3, 14). En este trabajo utilizaron partículas opsonizadas con suero hiperinmune (que contiene predominantemente una mezcla de diferentes subtipos de IgG) para los ensayos de fagocitosis. Esto se hizo con el fin de estimular los diferentes tipos de FcγRs en las células, de forma análoga a lo que ocurre *in vivo* durante el proceso de inflamación.

Los monocitos no son considerados células fagocíticas eficientes y en general parece difícil detectar niveles significativos de fagocitosis en estas (3, 14, 65, 66, 82). Sin embargo, observamos que la eficiencia del proceso de fagocitosis en monocitos THP-1 depende de la densidad del cultivo. Los niveles de fagocitosis más altos se registraron con células cultivadas a una densidad de alrededor de 0.8×10^6 células/ml. Células cultivadas a densidades mayores a 1×10^6 registraron niveles de fagocitosis notablemente menores. Desconocemos la razón del cambio en la eficiencia de fagocitosis en función de la densidad del cultivo. Sin embargo, existen reportes que señalan que los monocitos en cultivo producen moléculas capaces de alterar el estado de activación de las células. Entre éstas moléculas se encuentran IL-1, M-CSF, G-CSF y GM-CSF (97-99). Estas observaciones sugieren que quizá la eficiencia de fagocitosis en monocitos THP-1 puede verse alterada por diferentes moléculas producidas endógenamente por las células durante el cultivo.

La capacidad limitada que tienen los monocitos, con respecto a macrófagos y neutrófilos, para generar eficientemente respuestas celulares como la fagocitosis y estallido respiratorio (14, 19, 65, 69), sugiere que las enzimas que regulan estas respuestas en

monocitos podrían ser distintas a las enzimas que regulan las mismas respuestas en los fagocitos profesionales. Aunque se ha reportado que la enzima PI 3-K participa en la fagocitosis por FcγRs en neutrófilos y macrófagos (28, 56-60), el papel de esta enzima en la fagocitosis por FcγRs en monocitos no se había evaluado. En este trabajo reportamos que la fagocitosis por FcγRs procede de forma independiente de PI 3-K en monocitos. Por otra parte, también confirmamos que la fagocitosis por FcγRs en estas células procede de forma independiente de ERK, como se ha reportado (26).

Es importante señalar si bien PI 3-K y ERK parecen no participar en el proceso de fagocitosis en monocitos, estas enzimas sí son expresadas en éstas células y son activadas por el entrecruzamiento de FcγRs (Datos no mostrados). De hecho ambas enzimas forman parte de vías de señalización al núcleo, que inducen la expresión de genes que codifican para diferentes citocinas en monocitos (6, 27, 100). Estas observaciones indican que en monocitos, aunque las enzimas PI 3-K y ERK son activadas por entrecruzamiento de FcγR y son necesarias para la expresión de genes, éstas no forman parte de la maquinaria molecular que regula el proceso de fagocitosis por FcγR.

Existen reportes que indican que la enzima PI 3-K es necesaria para la fagocitosis por FcγR en macrófagos (56-58, 60). Los monocitos son los precursores en circulación de los macrófagos y, como vimos, no utilizan a las enzimas PI 3-K o ERK para la fagocitosis mediada por FcγRs. Esta observación nos sugirió que ambas enzimas debían ser reclutadas a la maquinaria fagocítica durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos. Para probar esta hipótesis diferenciamos monocitos THP-1 a macrófagos, y evaluamos la participación de ERK y PI 3-K en la fagocitosis por FcγRs en las células diferenciadas.

Existen diversos métodos para la diferenciación de monocitos a macrófagos. Algunos de ellos involucran el tratamiento de monocitos con ésteres de fórbol, AMP cíclico, vitamina D₃, interferón gamma (IFN- γ), y ácido retinóico (78, 82-85, 97, 101-104). El ácido retinóico se ha utilizado durante muchos años como agente de diferenciación de células hematopoyéticas (78, 82, 84). También se ha reportado que el uso de IFN- γ potencia el proceso de diferenciación de los monocitos (78, 82, 105). El tratamiento de monocitos THP-1 con ácido retinóico y con IFN- γ indujo su diferenciación a macrófagos. Los monocitos THP-1 crecen como una suspensión de células aisladas. El tratamiento de estas células con ácido retinóico y con IFN- γ indujo un aumento en la agregación celular y en las propiedades adhesivas de las células. Los cambios en adhesión y agregación celular se han descrito anteriormente en relación al proceso de diferenciación de monocitos, y se consideran indicativos de la diferenciación de estas células a macrófagos (82, 84, 102, 103, 106). Las células diferenciadas presentaron además otras características, que son propias de macrófagos (78, 82, 105, 107), entre ellas: mayor expresión en superficie de receptores Fc γ RI y Fc γ RIII, mayor expresión de moléculas MHC I y de integrinas β 2, y actividad reducida de la enzima mieloperoxidasa, que es típica de monocitos y granulocitos (Datos no mostrados).

En contraste a lo observado con los monocitos no diferenciados, la fagocitosis por Fc γ Rs en macrófagos derivados de monocitos fue sensible a los inhibidores de PI 3-K y de ERK, indicando así la participación de ambas enzimas en el proceso de fagocitosis por Fc γ Rs en estas células. Estos resultados confirmaron nuestra hipótesis de que las enzimas PI 3-K y ERK se reclutan a la maquinaria fagocítica durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos.

Es interesante resaltar que, durante la diferenciación de monocitos, el reclutamiento de PI 3-K y de ERK a la maquinaria fagocítica no ocurrió de forma simultánea. Primero se reclutó la enzima ERK, y posteriormente PI 3-K. Reportes recientes sugieren que ERK y PI 3-K juegan papeles distintos durante el proceso de fagocitosis. La enzima ERK parece estar involucrada en el proceso de señalización que pone en marcha la maquinaria fagocítica (47, 48, 52). La enzima PI 3-K por su parte, participa en los eventos finales del proceso de fagocitosis (en el cierre y la en internalización del fagosoma) (25, 56, 57). Bajo esta óptica el reclutamiento secuencial de las enzimas de ERK y PI 3-K a la maquinaria de fagocitosis parecería reflejar la importancia relativa que ambas enzimas poseen en el proceso de fagocitosis: ERK pone en marcha la maquinaria fagocítica y PI 3-K regula los eventos finales de éste proceso.

Se ha reportado que en algunos leucocitos el juego de enzimas que utiliza un receptor para generar una misma respuesta puede variar, dependiendo del estado de diferenciación de las células (108-110). Por ejemplo, los monocitos utilizan a la enzima PLD para la liberación de Ca^{+2} intracelular inducida por la estimulación del receptor $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ (110). Sin embargo, cuando éstos monocitos son diferenciados a macrófagos la liberación de Ca^{+2} inducida por estimulación de $\text{Fc}\gamma\text{Rs}$ se vuelve dependiente de la enzima PLC (110). También se ha reportado que la diferenciación de monocitos a macrófagos involucra cambios en la activación de distintas isoformas de PKC, por entrecruzamiento de $\text{Fc}\gamma\text{Rs}$ (109). Las isoformas de PKC que se activan por entrecruzamiento de $\text{Fc}\gamma\text{Rs}$ en monocitos son distintas de las isoformas de PKC que se activan en monocitos diferenciados a macrófagos (109). La idea de que distintos leucocitos pueden utilizar distintas vías de señalización para generar una misma respuesta no es por lo tanto realmente nueva. Sin

embargo, nuestros resultados muestran por primera vez la existencia de un "switch" molecular para la regulación de la fagocitosis por FcγRs, que depende del estado de diferenciación de los monocitos.

La observación de que sólo los fagocitos profesionales (i.e. neutrófilos y macrófagos) utilizan a las enzimas PI 3-K y ERK para la fagocitosis por FcγRs nos sugirió la idea de que la utilización de estas enzimas podría hacer más eficiente el proceso de fagocitosis en estas células. En general todos los fagocitos presentan un nivel de fagocitosis basal (i.e. fagocitosis no estimulada) relativamente bajo (15, 19, 66, 90). Sin embargo durante el proceso de inflamación los fagocitos son activados por diversas sustancias (citocinas, quimioatrayentes y otros agentes proinflamatorios, como prostaglandinas y leucotrienos) que pueden estimular respuestas celulares como la fagocitosis y el estallido respiratorio, haciéndolas más intensas (14-16, 19, 66). Concordando con lo anterior, nuestros resultados mostraron que los niveles de fagocitosis no estimulada fueron muy similares entre neutrófilos, macrófagos y monocitos. Sin embargo, cuando los fagocitos fueron estimulados con ésteres de fórbol (PMA), los neutrófilos y los macrófagos presentaron niveles de fagocitosis notablemente mayores que los niveles de fagocitosis de los monocitos estimulados bajo las mismas condiciones. Los altos niveles de fagocitosis inducidos en neutrófilos y macrófagos por estimulación con PMA, apoyan la idea de que la utilización de PI 3-K y ERK en la fagocitosis por FcγRs permite a estas células generar respuestas fagocíticas intensas.

Se ha reportado que el juego de enzimas o segundos mensajeros que participan en una determinada respuesta celular puede cambiar dependiendo de las condiciones de activación de algunos leucocitos (39, 91-93). Por ejemplo, en neutrófilos la fagocitosis

basal no depende de calcio, sin embargo cuando las células son estimuladas con fMLP su actividad fagocítica se vuelve dependiente de calcio (39). Por esta razón decidimos confirmar que la mayor eficiencia de fagocitosis observada en neutrófilos y en macrófagos estimulados con PMA, involucraba tanto la participación de PI 3-K como la participación de ERK. La inhibición de ERK en neutrófilos y macrófagos redujo considerablemente el nivel de fagocitosis por FcγRs, estimulada con PMA. Este resultado confirma la participación de esta enzima en el proceso de fagocitosis estimulada, en los fagocitos profesionales. En neutrófilos y macrófagos sin embargo, la inhibición de PI 3-K no tuvo efecto sobre los niveles de fagocitosis estimulada con PMA. Los ésteres de fórbol son sin embargo, activadores de las enzimas de la familia de PKC, algunas de las cuales pueden ser reguladas por los productos de la actividad enzimática de PI 3-K, a saber fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato y fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (47, 55, 62, 94). Esta observación sugiere la posibilidad de que, dentro de la cascada de enzimas que regulan el proceso de fagocitosis en fagocitos profesionales, la enzima PI 3-K esté regulando algunas isoformas de PKC involucradas en el proceso de fagocitosis. De esta forma, la activación directa de PKC con ésteres de fórbol haría innecesaria la actividad de PI 3-K para el proceso de fagocitosis. Así, la inhibición de PI 3-K por wortmanina parecería no tener efecto sobre la actividad fagocítica de neutrófilos y macrófagos estimulados con PMA. Por otra parte, los macrófagos diferenciados por 24 horas con IFN-γ presentan un nivel de fagocitosis estimulada muy bajo, semejante al de monocitos (Datos no mostrados). A las 24 horas de diferenciación estas células ya utilizan ERK, pero no PI 3-K para fagocitosis (Fig. 13). Esto sugiere que tanto ERK como PI 3-K son necesarias para la generación de una respuesta de fagocitosis eficiente, en condiciones de estimulación.

Acorde con la idea de la regulación de PKC por PI 3-K durante el proceso de fagocitosis, están una serie de reportes que señalan que las enzimas PKC δ y PKC ϵ se translocan a los fagosomas en las fases tardías del proceso de fagocitosis, sugiriendo que estas enzimas también forman parte de la maquinaria fagocítica (25, 63, 64). Es interesante resaltar que tanto PKC δ como PKC ϵ pueden ser activadas por los productos de la actividad enzimática de PI 3-K (25, 55, 62, 111). Las enzimas PKC δ y PKC ϵ , a diferencia de las isoformas clásicas PKC α , PKC β y PKC γ , son además enzimas no reguladas por calcio (25, 41, 112). La participación de PKC δ y PKC ϵ en el proceso de fagocitosis concuerda entonces con la independencia de la respuesta de calcio que presentaron los fagocitos durante la fagocitosis por Fc γ Rs. Por otra parte, las proteínas llamadas MARKs son sustratos de PKC con capacidad de regular el reordenamiento del citoesqueleto de actina. Las MARKs se han encontrado localizadas alrededor de los fagosomas durante el proceso de fagocitosis (14, 24, 40). La fosforilación de estas proteínas por PKC induce la despolimerización de los filamentos de actina (14, 24, 40). Éste es un evento necesario para la internalización final del fagosoma y su fusión con vesículas lisosomales (24, 40). Bajo esta óptica el papel de PI 3-K en la regulación de las fases tardías del proceso de fagocitosis podría estar relacionado con la activación de PKC δ y PKC ϵ . Estas enzimas podrían a su vez activar MARKs e inducir la despolimerización local de los filamentos de actina, permitiendo así la internalización del fagosoma y su fusión con las vesículas lisosomales.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

En conclusión, nuestros resultados demuestran por primera vez que en monocitos el proceso de fagocitosis mediada por FcγRs es independiente de la PI 3-K, y que la diferenciación de monocitos a macrófagos, por tratamiento con ácido retinóico e IFN-γ involucra el reclutamiento ordenado de ERK y de PI 3-K a la maquinaria fagocítica. Primero se recluta ERK y posteriormente PI 3-K. Por otro lado, nuestros resultados sugieren que la utilización de ERK y PI 3-K por fagocitos profesionales (neutrófilos y macrófagos) hace más eficiente la respuesta fagocítica mediada por FcγRs, y que al menos ERK participa directamente en la fagocitosis estimulada con ésteres de fórbol, en neutrófilos y en macrófagos.

VI.2 Medición de fagocitosis por citometría de flujo y aplicación de esta técnica a estudios de señalización intracelular.

El método tradicional para medir fagocitosis, que involucra el análisis microscópico de los fagocitos, aunque es preciso confiable, resulta tedioso y toma mucho tiempo (70, 71). Aunque se han publicado diferentes métodos para medir fagocitosis por citometría de flujo (CMF) (72-74), todos ellos son aplicables a un solo tipo celular, y en general su uso se ha limitado a análisis de tipo clínico (71, 75-77). En este trabajo se planteó la implementación de un método alternativo para medir fagocitosis basado en la citometría de flujo (CMF), que pueda aplicarse a estudios sobre los eventos de señalización intracelular que regulan el proceso de fagocitosis, y que sea aplicable a más de un tipo celular.

Las diferencias de tamaño (FSC) y de granularidad (SSC) entre eritrocitos y neutrófilos, y entre eritrocitos y monocitos nos permitieron analizar por CMF de forma independiente cada población de fagocitos (neutrófilos o monocitos). Esto nos permitió analizar de forma directa cambios en el nivel de fluorescencia de las poblaciones de fagocitos, sin interferencia del alto nivel de fluorescencia de la población de eritrocitos fluorescentes. La medición de fagocitosis por CMF se basó en el análisis del porcentaje de células fluorescentes en las poblaciones de neutrófilos y de monocitos. Utilizando la CMF pudimos detectar fagocitosis estimulada con ésteres de fórbol, en neutrófilos y en monocitos. Nuestro método de análisis de fagocitosis por CMF también nos permitió detectar respuestas fagocíticas modestas, como las que se esperan de neutrófilos y de monocitos no estimulados.

Para determinar la sensibilidad del análisis de fagocitosis por CMF, a cambios sutiles en los niveles de fagocitosis, se generaron curvas dosis-respuesta de fagocitosis

utilizando concentraciones crecientes de PMA. Conforme aumentamos la concentración del estímulo (PMA) registramos incrementos graduales en los niveles de fagocitosis en neutrófilos y en monocitos. Las curvas dosis-respuesta de fagocitosis obtenidas por CMF fueron muy similares a las que se obtuvieron por microscopía de luz en neutrófilos y en monocitos. En neutrófilos también observamos cambios graduales en los niveles de fagocitosis, cuando las células se estimularon con distintas concentraciones del quimioatrayente fMLP (Datos no mostrados). Estos resultados indican que nuestro método de análisis de fagocitosis por CMF es sensible a pequeños cambios en los niveles de fagocitosis, inducidos por la activación de las células con diferentes sustancias.

La CMF nos permitió también detectar cambios en los niveles de fagocitosis, inducidos por la inhibición farmacológica de enzimas que participan en el proceso de fagocitosis. La CMF resultó tan sensible como la microscopía de luz, a cambios en los niveles de fagocitosis, inducidos por el tratamiento de neutrófilos y monocitos con inhibidores de PI 3-K y ERK, y con citocalasina B.

Es importante señalar que nuestro método de análisis de fagocitosis por CMF no refleja en realidad la capacidad fagocítica que unas células tienen con respecto a las otras. Aunque el análisis de fagocitosis por CMF muestra un mayor porcentaje de células fluorescentes en la población de monocitos con respecto a la población de neutrófilos (Fig. 23), los monocitos presentan en realidad niveles de fagocitosis similares a los de los neutrófilos (Fig. 9 y 11), y de hecho niveles de fagocitosis más bajos que los de neutrófilos en condiciones de estimulación (Fig. 15). Aunque desconocemos porqué en nuestros ensayos de fagocitosis el porcentaje de células fluorescentes en la población de monocitos es mayor que en la población de neutrófilos, es posible que la causa de esto esté relacionada con las diferencias del nivel de fluorescencia basal de las distintas células, y los cambios en

el nivel de fluorescencia basal en función del estado de activación de las células (113-116). Por otro lado, el índice fagocítico (número de partículas ingeridas por 100 células) es un estimado de la capacidad fagocítica de una población. La inconsistencia entre el porcentaje de células fluorescentes y el índice fagocítico podría estar también relacionada con la capacidad de cada célula para ingerir partículas opsonizadas. De esta forma, un mayor porcentaje de monocitos fluorescentes podría indicar que un mayor número de estas células ingiere partículas, aún si el número de partículas ingeridas por la población total es menor, como se observa al evaluar el índice fagocítico. Dado que los cambios en los niveles de fagocitosis de neutrófilos o de monocitos se evaluaron con respecto al mismo tipo celular en diferentes condiciones, la inconsistencia entre el porcentaje de células fluorescentes y el índice fagocítico no invalida nuestro método de análisis. Es posible sin embargo, que el uso un fluorocromo con espectro de emisión distinto al de la fluoresceína (que se usó para marcar a los eritrocitos) pueda corregir esta aparente discrepancia entre los niveles de fagocitosis reales de neutrófilos y monocitos, y el porcentaje de células fluorescentes en las poblaciones de ambos tipos celulares.

En conclusión, nuestro método de análisis de fagocitosis por CMF permite detectar cambios en los niveles de fagocitosis de neutrófilos y monocitos, en función del estado de activación celular. Este método es sensible también a la inhibición de enzimas importantes para el desarrollo del proceso de fagocitosis, por lo que puede ser utilizado para el análisis de los eventos de señalización intracelular que lo regulan.

VII. BIBLIOGRAFIA.

1. Sánchez-Mejorada, G. and C. Rosales, *Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors*. Journal of Leukocyte Biology, 1998. **63** p. 521-533.
2. Rankin, B., *et al.*, *Stimulation of tyrosine phosphorylation and calcium mobilization by Fcγ receptor cross-linking: regulation by the phosphotyrosine phosphatase CD45*. The Journal of Immunology, 1993. **150** p. 605-616.
3. Janeway, C. and P. Travers, *Immunobiology*. 3rd ed. 1997, New York-London: Garland Publishing Inc.-Current Biology.
4. Santana, C., *et al.*, *Protein tyrosine phosphorylation in leukocyte activation through receptors for IgG*. Journal of Leukocyte Biology, 1996. **60** p. 433-440.
5. Ericson, S., *et al.*, *Interleukin-6 production by human neutrophils after Fc-Receptor cross-linking or exposure to colony-stimulating factor*. Blood, 1998. **91** p. 2099-2107.
6. Trotta, R., P. Kanakaraj, and B. Perussia, *FcγR-dependent Mitogen-activated protein kinase activation in leukocytes: A common signal transduction event necessary for expression of TNF-α and early activation genes*. The Journal of Experimental Medicine, 1996. **184** p. 1027-1035.
7. Borregard, N., *et al.*, *Human neutrophil granules and secretory vesicles*. European Journal of Haematology, 1993. **51** p. 187-195.
8. Benhamou, M., *et al.*, *High affinity IgE receptor -mediated stimulation of rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells induces early and late protein tyrosine phosphorylation*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267** p. 7310-7314.

9. Metzger, *The receptor with high affinity for IgE*. Immunological Reviews, 1992. 125 p. 37-48.
10. Gumperz, J. and P. Parham, *The enigma of the natural killer cell*. Nature, 1995. 378 p. 245-248.
11. Trinchieri, G., *Natural killer cells wear different hats: effector cells of innate resistance and regulatory cells of adaptive immunity and of hematopoiesis*. Seminars of Immunology, 1995. 7 p. 83-88.
12. Morel, F., J. Doussiere, and P. Vignais, *The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects*. European Journal of Biochemistry, 1991. 201 p. 523-546.
13. Allen, L.-A. and A. Aderem, *Mechanisms of phagocytosis*. Current Opinion in Cell biology, 1996. 8 p. 36-40.
14. Jones, S.L., F.P. Lindberg, and B.E. J., *Phagocytosis*, in *Fundamental Immunology*, W.E. Paul, Editor. 1999, Lippincott-Raven: Philadelphia. p. 997-1020.
15. Brown, E.J., *Phagocytosis*. Bioessays, 1995. 17 p. 109-117.
16. Wright, S. and P. Demeters, *Receptor-mediated Phagocytosis*, in *The lung: Scientific Foundations*, R. Crystal, Editor. 1991, Raven Press: New York. p. 539-551.
17. Bellavite, P., *The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes*. Free Radicals and Biological Medicine, 1988. 4 p. 225-261.
18. Strzelecka, A., K. Kwiatowska, and A. Sobota, *Tyrosine phosphorylation and Fcγ receptor-mediated phagocytosis*. FEBS Letters, 1997. 400 p. 11-14.

19. Rosales, C. and E. Brown, *Neutrophil receptors and modulation of the immune response*, in *The Neutrophil*, J. Abramson and J. Wheeler, Editors. 1993, Oxford University Press: Oxford. p. 23-62.
20. Isakov, N., *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signaling cascades*. *Journal of Leukocyte Biology*, 1997. **61** p. 6-16.
21. Salmon, J., *et al.*, *Fcγ receptor III induces actin polymerization in human neutrophils and primes phagocytosis mediated by Fcγ receptor II*. *The Journal of Immunology*, 1991. **146** p. 997-1004.
22. Rosales, C. and E.J. Brown, *Signal transduction by neutrophil immunoglobulin G Fc receptors: Dissociation of [Ca⁺²] rise from inositol 1,4,5-trisphosphate*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992. **267** p. 5265-5271.
23. Kimberly, R., *et al.*, *The glycosyl phosphatidylinositol-linked FcγRIII_{PMN} mediates transmembrane signaling events distinct from FcγRII*. *Journal of Experimental Medicine*, 1990. **171** p. 1239-1255.
24. Kwiatkowska, K. and A. Sobota, *Signaling pathways in phagocytosis*. *Bioessays*, 1999. **21** p. 422-431.
25. Lennartz, M.R., *Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis*. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 1999. **31** p. 415-430.
26. Karimi, K. and M. Lennertz, *Mitogen-activated protein kinase is activated during IgG-mediated phagocytosis, but is not required for target ingestion*. *Inflammation*, 1998. **22** p. 67-82.

27. Sánchez-Mejorada, G. and C. Rosales, *Fcy receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in monocytes is independent of Ras*. Journal of Biological Chemistry, 1998. 273 p. 27610-27619.
28. Raeder, E., et al., *Syk activation initiates downstream signaling events during human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis*. The Journal of Immunology, 1999. 163 p. 6785-6393.
29. Galandrini, R., et al., *CD16-mediated p21^{ras} activation is associated with Shc and p36 tyrosine phosphorylation and their binding with Grb2 in human natural killer cells*. Journal of Experimental Medicine, 1996. 183 p. 176-186.
30. Greenberg, S., *Modular Components of phagocytosis*. Journal of Leukocyte Biology, 1999. 66 p. 712-717.
31. Nobes, C. and A. Hall, *Rho, Rac, and Cdc42 GTPase regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibres, lamellipodia, and filopodia*. Cell, 1995. 81 p. 53-62.
32. Cox, D., et al., *Requirement for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes*. Journal of Experimental Medicine, 1997. 186 p. 1487-1494.
33. Hackman, D., et al., *Rho is required for the initiation of calcium signaling and phagocytosis by Fcy receptor in macrophages*. Journal of Experimental Medicine, 1997. 186 p. 955-966.
34. Bianca, V., M. Grzeskowiak, and F. Rossi, *Studies on molecular regulation of phagocytosis and activation of NADPH oxidase in neutrophils: IgG and C3b-mediated ingestion and associated respiratory burst independent of phospholipid*

- turnover and Ca^{2+} transients. *The Journal of Immunology*, 1990. **144** p. 1411-1417.
35. Di virgilio, F., *et al.*, *Fc receptor -mediated phagocytosis occurs in macrophages at exceedingly low cytosolic Ca^{2+} levels*. *The Journal of Cell Biology*, 1988. **106** p. 657-666.
36. Greenberg, S., *et al.*, *Ca^{2+} -independent f-actin assembly and disassembly during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages*. *The Journal of Cell Biology*, 1991. **113** p. 757-767.
37. Mc Neil, P., *et al.*, *Fc-receptor-mediated phagocytosis occurs in macrophages without an increase in average $[Ca^{++}]_i$* . *The Journal of Cell Biology*, 1986. **102** p. 1586-1592.
38. Zimmerli, S., *et al.*, *Phagosome-lysosome fusion is a calcium-independent event in macrophages*. *The Journal of Cell Biology*, 1996. **132** p. 49-61.
39. Rosales, C. and E. Brown, *Two mechanisms for IgG Fc-receptor-mediated phagocytosis by human neutrophils*. *The Journal of Immunology*, 1991. **146** p. 3937-3944.
40. Aderem, A. and D.M. Underhill, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. *Annual Review of Immunology*, 1999. **17** p. 593-623.
41. Dekker, L. and P. Parker, *Protein kinase C: a question of specificity*. *Trends in Biochemical Sciences*, 1994. **19** p. 73-77.
42. Karimi, K. and M. Lenartz, *Protein kinase C activation precedes arachidonic acid release during IgG-mediated phagocytosis*. *The Journal of Immunology*, 1995. **155** p. 5786-5794.

43. Lennartz, M., *et al.*, *Immunoglobulin G-mediated phagocytosis activates a calcium-independent phosphatidylethanolamine-specific phospholipase*. *Journal of Leukocyte Biology*, 1993. **54** p. 389-398.
44. Suchard, S., *et al.*, *Ceramide inhibits IgG-dependent phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes*. *Blood*, 1997. **89** p. 2139-2147.
45. Fitzer-Attas, C., *et al.*, *Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, fgr, and Lyn*. *Journal of Experimental Medicine*, 2000. **191** p. 669-682.
46. Downey, G., *et al.*, *Importance of MEK in neutrophil microbicidal responsiveness*. *The Journal of Immunology*, 1998. **160** p. 434-443.
47. Mansfield, P., J. Shayman, and L. Boxer, *Regulation of polymorphonuclear leukocyte phagocytosis by myosin light chain kinase after activation of mitogen-activated protein kinase*. *Blood*, 2000. **95** p. 2407-2412.
48. Suchard, S., *et al.*, *Mitogen-activated protein kinase activation during IgG-dependent phagocytosis in human neutrophils: inhibition by ceramide*. *The Journal of Immunology*, 1997. **158** p. 4961-4967.
49. Seger, R. and E. Krebs, *The MAPK signaling cascade*. *FASEB Journal*, 1995. **9** p. 726-735.
50. Su, B. and M. Karin, *Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression*. *Current Opinion in Immunology*, 1996. **8** p. 402-411.
51. Waskiewicz, A. and J. Cooper, *Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast*. *Current Opinion in Cell Biology*, 1995. **7** p. 798-805.

52. Raeder, E., *et al.*, *Sphingosine blocks human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis through inhibition of Mitogen-activated Protein Kinase activation.* Blood, 1999. 93 p. 686-693.
53. Garrington, T.P. and G.L. Johnson, *Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways.* Current Opinion in Cell Biology, 1999. 11 p. 211-218.
54. Carpenter, C.L. and L.C. Cantley, *Phosphoinositide kinases.* Current Opinion in Cell Biology, 1996. 8 p. 153-158.
55. Toker, A. and L. Cantley, *Signaling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase.* Nature, 1997. 387 p. 673-676.
56. Araki, N., M. Johnson, and J. Swanson, *A role for phosphoinositide 3-kinase in completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages.* Journal of Cell Biology, 1996. 135 p. 1249-1260.
57. Cox, D., *et al.*, *A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension.* Journal of Biological Chemistry, 1999. 274 p. 1240-1247.
58. Crowley, M., *et al.*, *A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc γ receptors on macrophages.* Journal of Experimental Medicine, 1997. 186 p. 1027-1039.
59. Yamamori, T., *et al.*, *Roles of p38, PKc and PI3-K in the signaling pathways of NADPH oxidase activation and phagocytosis in bovine polymorphonuclear leukocytes.* FEBS Letters, 2000. 467 p. 253-258.
60. Ninomiya, N., *et al.*, *Involvement of Phosphatidylinositol 3-kinase in Fc γ receptor signaling.* Journal of Biological Chemistry, 1994. 269 p. 22732-22737.

61. Vanhasebroek, B., *et al.*, *Phosphoinositide kinases: a conserved family of signal transducers*. Trends in Biochemical Science, 1997. **22** p. 267-272.
62. Toker, A., *et al.*, *Activation of protein kinase C family members by the novel phosphoinositides PtdIns-3,4-P₂ and PtdIns-3-4-5-P₃*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269** p. 32358-32367.
63. Brumell, J., *et al.*, *Expression of the protein kinase C substrate pleckstrin in macrophages: association with phagosomal membranes*. The Journal of Immunology, 1999. **163** p. 3388-3365.
64. Zheng, L., *et al.*, *Role of protein kinase C isozymes in Fcγ receptor-mediated intracellular killing of Staphylococcus aureus by human monocytes*. The Journal of Immunology, 1995. **155** p. 776-784.
65. Gordon, S., *The macrophage*. Bioessays, 1995. **17** p. 977-986.
66. Gordon, S., *Macrophages and the immune response*, in *Fundamental Immunology*, W.E. Paul, Editor. 1999, Lippincott-Raven: Philadelphia. p. 533-547.
67. Gijón, M. and C. Leslie, *Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation*. Journal of Leukocyte Biology, 1999. **65** p. 330-336.
68. Gijón, M., *et al.*, *Cytosolic phospholipase A2 is required for macrophage arachidonic acid release by agonists that Do and Do not mobilize calcium. Role of mitogen-activated protein kinase in cytosolic phospholipase A2 regulation*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275** p. 20146-20156.
69. Rabinovitch, M., *Professional and non-professional phagocytes: an introduction*. Trends in cell Biology, 1995. **5** p. 85-88.

70. Oda, T. and H. Maeda, *A new simple fluorometric assay for phagocytosis*. Journal of Immunological Methods, 1986. **88** p. 175-183.
71. Casado, J.A., *et al.*, *Simultaneous evaluation of phagocytosis and FcγR-mediated oxidative burst in human monocytes by a simple flow cytometry method*. Journal of Immunological Methods, 1993. **153** p. 173-176.
72. Hampton, M.B. and C.C. Winterbourn, *Methods for quantifying phagocytosis and bacterial killing by human neutrophils*. Journal of Immunological Methods, 1999. **232** p. 15-22.
73. Eeden, S.F., *et al.*, *The use of flow cytometry to measure neutrophil function*. Journal of Immunological Methods, 1999. **232** p. 23-43.
74. Bjerknes, R., *et al.*, *Flow cytometry for the study of phagocyte functions*. Reviews of Infectious Diseases, 1989. **11** p. 16-33.
75. Carulli, G., *Applications of flow cytometry in the study of human neutrophil biology and pathology*. Hematopathology and Molecular Hematology, 1996. **10** p. 39-61.
76. Heinzelmann, M., *et al.*, *Quantification of phagocytosis in human neutrophils by flow cytometry*. Microbiological Immunology, 1999. **43** p. 505-512.
77. Torché, A., *et al.*, *Flow cytometry and optical microscopic evaluation of poly(D, L-lactide-co-glycolide) microspheres phagocytosis by pig alveolar macrophages*. Journal of Controlled Release, 1999. **58** p. 289-301.
78. Nakamura, T., *et al.*, *Variants of a human monocytic leukemia cell line (THP-1): induction of differentiation by retinoic acid, interferon-gamma, and T-lymphocyte-derived differentiation-inducing activity*. Journal of the National Cancer Institute, 1986. **77** p. 21-27.

79. Verelizier, J., *et al.*, *Pure interferon gamma enhances class II HLA antigens on human monocyte cell lines*. *European Journal of Immunology*, 1984. **74** p. 106-108.
80. Tsuchiya, S., *et al.*, *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)*. *International Journal of Cancer*, 1980. **26** p. 2 171-2176.
81. Drexler, H., *et al.*, *Changes in isoenzyme profiles during induction of differentiation in human myelomonocytic leukemia cell lines*. *Cancer Research*, 1986. **46** p. 6048-6082.
82. Harris, P. and P. Ralph, *Human leukemic models for myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines*. *Journal of Leukocyte Biology*, 1985. **37** p. 407-422.
83. Turpin, J., M. Vargo, and M. Meltzer, *Enhanced HIV-1 replication in retinoid-treated monocytes: Retinoid effects mediated through mechanisms related to cell differentiation and to a direct transcriptional action on viral gene expression*. *The Journal of Immunology*, 1992. **148** p. 2539-2546.
84. Miyaura, C., *et al.*, *Alternative differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) induced selectively by retinoic acid and 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3*. *Cancer Research*, 1985. **45** p. 4244-4248.
85. Hauck, C.R., *et al.*, *An in vitro-differentiated human cell line is a model system to study the interaction of pathogenic neisseriae with phagocytic cells*. *Infection and Immunity*, 1997. **65** p. 1863-1869.
86. Scott, M., *et al.*, *Effect of osmotic lysis and resealing on red cell structure and function*. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1990. **115** p. 470-480.
87. Weimer, R., *Estadística*. Second ed. 1999, México D.F.: CECSA.

88. Maftah, A., et al., *Flow cytometry's contribution to the measurement of cell functions*. *Biology of the Cell*, 1993. 78 p. 85-93.
89. van Eeden, S., et al., *The use of flow cytometry to measure neutrophil function*. *Journal of Immunological Methods*, 1999. 232 p. 23-43.
90. Rosenberg, H. and J. Gallin, *Inflammation*, in *Fundamental Immunology*, W. Paul, Editor. 1999, Lippincott-Raven: Philadelphia. p. 1051-1066.
91. Binder, R., et al., *Neutrophil priming by cytokines and vitamin D binding protein (Gc-globulin): impact on C5a-mediated chemotaxis, degranulation and respiratory burst*. *Molecular Immunology*, 1999. 36 p. 885-892.
92. Edwards, S., *Cell signalling by integrins and immunoglobulin receptors in primed neutrophils*. *Trends in Biochemical Science*, 1995. 20 p. 362-367.
93. Downey, G., et al., *Intracellular signaling in neutrophil priming and activation*. *Seminars in Cell Biology*, 1995. 6 p. 345-356.
94. Singh, S., et al., *Activation of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1993. 195 p. 104-112.
95. Lowell, C. and G. Berton, *Integrin signal transduction in myeloid leukocytes*. *Journal of Leukocyte Biology*, 1999. 65 p. 313-320.
96. Brown, E. and F. Lindberg, *Leucocyte adhesion molecules in host defense against infection*. *Annals of Medicine*, 1996. 28 p. 201-208.
97. Wang, Y., et al., *Production of granulocyte colony-stimulating factor by THP-1 cells in response to retinoic acid and phorbol esters is mediated through the autocrine production of interleukin-1*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996. 225 p. 639-646.

98. Charboard, P., *et al.*, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in human long term bone marrow cultures: endogenous production and effect of exogenous GM-CSF on granulomonopoiesis*. *Blood*, 1991. **78** p. 1230-1236.
99. Asakura, E., N. Tojo, and T. Tanabe, *Monocyte proliferation induced by modified serum is associated with endogenous M-CSF production: evidence for involvement of a signaling pathway via scavenger receptors*. *Cellular Proliferation*, 1999. **32** p. 185-194.
100. D'Addario, M., *et al.*, *Epstein-Barr virus envelope glycoprotein gp350 induces NF-kappaB activation and IL-1beta synthesis in human monocytes-macrophages involving PKC and PI3-K*. *FASEB Journal*, 1999. **13** p. 2203-2213.
101. Blotling, J., *et al.*, *Vitamin D3-and retinoic acid-induced monocytic differentiation: interactions between the endogenous vitamin D3 receptor, retinoic acid receptors, and terinoid X receptors in U-937 cells*. *Cell Growth and Differentiation*, 1996. **7** p. 1239-1249.
102. Hayashi, K., *et al.*, *Metabolic changes in LDL receptors and an appearance of scavenger receptors after phorbol ester-induced differentiation of U937 cells*. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1991. **1082** p. 152-160.
103. Tucker, K., *et al.*, *Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PBL-985) with granulocytic and monocytic differentiation capacity*. *Blood*, 1987. **70** p. 372-378.
104. Zhu, L., *et al.*, *9-cis retinoic acid induces monocyte chemottractant protein-1 secretion in human monocytic THP-1 cells*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 1999. **19** p. 2105-2111.

105. Harris, P., *et al.*, *Distinct activities of interferon- γ , lymphokine and cytokine differentiation inducing factors acting on the human monoblastic leukemia cell line U937*. *Cancer Research*, 1985. **45** p. 9-13.
106. Jendraschak, E., *et al.*, *IGF-1, PDGF and Cd18 are adherence-responsive genes: regulation during monocyte differentiation*. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1998. **1396** p. 320-335.
107. Gaffney, E., *et al.*, *Regulation by interferon γ of function in the acute monocytic leukemia cell line, THP-1*. *Journal of Leukocyte Biology*, 1988. **43** p. 248-255.
108. Roberts, P., *et al.*, *Differentiation-linked activation of the respiratory burst in a monocytic cell line (U937) via Fc γ RII: a study of activation pathways and their regulation*. *The Journal of Immunology*, 1991. **147** p. 3104-3115.
109. Melendez, A., M. Harnett, and J. Allen, *Differentiation-dependent switch in protein kinase C isoenzyme activation by Fc γ RI, the human high-affinity receptor for immunoglobulin G*. *Immunology*, 1999. **96** p. 457-464.
110. Melendez, A., *et al.*, *A molecular switch changes the signaling pathway used by the Fc γ RI antibody receptor to mobilise calcium*. *Current Biology*, 1998. **8** p. 210-221.
111. Wymann, M., *et al.*, *Lipids on the move: phosphoinositide 3-kinases in leukocyte function*. *Immunology Today*, 2000. **21** p. 260-264.
112. Mochly-Rosen, D. and A. Gordon, *Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity*. *FASEB Journal*, 1998. **12** p. 35-42.

113. Tooka, Y., *et al.*, *The integrin $\alpha9\beta1$ mediates adhesion to activated endothelial cells, and transendothelial neutrophil migration from interaction with vascular adhesion molecule-1.* The Journal of Cell Biology, 1999. 145 p. 413-420.
114. Hafeman, D., *et al.*, *Neutrophil activation monitored by flow cytometry: stimulation by phorbol diester is an all-or-none event.* Science, 1982. 215 p. 673-675.
115. Thorell, B., *Intracellular red-ox steady states as basis for cell characterization by flow cytofluorometry.* Blood Cells, 1980. 6 p. 39-43.
116. Thorell, B., *Flow cytometric analysis of cellular endogenous fluorescence simultaneously with emission from exogenous fluorochromes, light scatter and absorption.* Cytometry, 1981. 2 p. 39-43.