



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

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

PARTICIPACION DEL INTERFERON GAMMA (IFN- γ), FACTOR
DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α) Y LA INTERLEUCINA
1 BETA (IL-1 β), EN LA MODULACION DE LA EXPRESION DE
RECEPTORES Fc GAMMA (Fc γ R) EN LA LINEA CELULAR
PROGENITORA MIELOIDE 32D.

TESIS DE LICENCIATURA
YOLANDA CORDOVA GALAVIZ

AREA:
BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR DEL CANCER

ASESOR: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

MEXICO D F. OCTUBRE DE 2003.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

En aras de encontrar el camino que nos salve de las garras de la Patafísica.

" A medida que progreseemos y despertemos al alma que está en nosotros y en todas las cosas, nos daremos cuenta de que hay conciencia también en la planta, en el metal, en el átomo, en la electricidad y en todas las cosas que pertenecen a la naturaleza física". *Sri Aurobindo*.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr Benny Weiss Steider creador de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Molecular del Cáncer, por permitirme realizar mi trabajo de tesis en sus instalaciones.

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio, por apoyarme siempre e incondicionalmente en todos los aspectos, más allá del deber.

Al Dr. Isaac R. Zambrano, por iniciarme en la investigación.

Al C.D. Gerardo Ramos Mandujano por sus enseñanzas en las técnicas de laboratorio y su apoyo.

Al M. en C. Jorge Hernández por transmitirme un poco de sus conocimientos, por sacarme de apuros y aclarar mis dudas en metodología.

Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez, Dr. Alberto Monroy, y Dra. Lourdes Mora, por todo su apoyo.

Al Ing. Nestor Mendo por su apoyo en los tramites de becas PAPIIT.

Al M. en B.E. Enrique Mendieta Marquez, Dr. Edelmiro Santiago Osorio, M. en C. Luis Sánchez Sánchez, Dr José Luis Moran Perales, M. en C. Jorge Hernández Montes, quienes fungieron como mis sinodales de tesis. Gracias por sus aportaciones.

Esta tesis contó con el apoyo de becas para licenciatura de PAPIIT IN215199.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dedicatorias.

A mis Padres: Adán Córdova Alcaráz, por su apoyo total y su cariño; Rosa Galaviz Hernández, por darme la vida.

A mis hermanas: Rosa, Alicia, Verónica y Victoria por ser también mis madres, cómplices, compañeras de juego, confidentes, y ejemplos de vida.

A mis sobrinos: Adán, Andrea, Iván, Víctor, Sebastián y Nayely, por contagiarme por momentos su alegría e inocencia, por conocer de nuevo el mundo a través de sus ojos.

A mi innumerable familia: Por todo su apoyo.

A mis amigos: En estricto orden de antigüedad, Edna, Ayerim, César, quienes me acompañaron en mis inicios, y me contagiaron un poco de su optimismo, inocencia, inteligencia y sobriedad.

Mauricio, Rubén, y Miguel, mis inseparables amigos desde antes de la huelga y después.

A Imelda, ejemplo de bondad y solidaridad.

A Gaby, mi inseparable y confidente, por su inocencia, por su sencillez, ejemplo de integridad y por ser mi gran amiga.

A mi gran amigo Fernando López, por ayudarme a discernir, por escuchar mi filosofía opiácea, por ser como un hermano para mí.

A Edgar, por ser un gran amigo, por estar siempre ahí, por todo lo que me ha enseñado en lo académico y en lo espiritual, por ser un ejemplo de perseverancia, por ser como es.

A mis amigos del laboratorio: Edgar, Adriana, Hugo, Miguelito, Flor, Lulú (Victor), que me hicieron sentir en casa. A las niñas Laurita y Brenda que trajeron nuevos aires al laboratorio, y me enseñaron que no es tan fácil transmitir los conocimientos.

A los colegas, Fer, Jesús, Mario y a todos mis compañeros de Biología.

Al bing bang.

TESIS CON
FALLA DE URGEN

INDICE.

	5
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
MARCO TEÓRICO	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS	31
OBJETIVO	32
METODOLOGÍA	37
RESULTADOS	41
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ABREVIATURAS.

ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
CCDA	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
DEPC	dietilpírocarbonato
EDTA	etilendiamintetracetato
Fc γ R(s)	receptor(es) para la fracción cristalizable de la Inmunoglobulina G
Fc γ RI	receptor Fc gamma tipo I
Fc γ RIA	gen para el Fc γ RI tipo A
Fc γ R1a	isoforma del gen para el Fc γ RI tipo A
Fc γ R1B	gen para el Fc γ RI tipo B
Fc γ RIC	gen para el Fc γ RI tipo C
Fc γ RII	receptor Fc gamma tipo II
Fc γ RIII	receptor Fc gamma tipo III
G-CSF	factor estimulador de colonias de granulocitos
GM-CSF	factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos
h Fc γ R	receptor Fc gamma humano
IFN- γ	interferón gama
Ig	Inmunoglobulina
IL-10	interleucina 10
IL-13	interleucina 13
IL-1 β	interleucina 1 beta
IL-3	interleucina 3
IL-4	interleucina 4
ITAM	segmento de activación a base de tirosina
ITIM	segmento de inhibición a base de tirosina
m Fc γ R	receptor Fc gamma de ratón
MHC II	Complejo principal de Histocompatibilidad clase II
PTK	cinasa de proteínas con especificidad por tirosinas
PTP	fosfatasa de proteínas con especificidad por tirosinas
RT-PCR	reacción inversa unida a la reacción en cadena de la polimerasa
SHP	fosfatasa de proteínas con especificidad por tirosinas que contienen dominios S ¹ /2
Src	familia de cinasas de tirosinas
Syk	familia de cinasas de tirosinas
TCR	Receptor del linfocito T
TGF- β	factor de crecimiento transformante beta
TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN.

El sistema inmune tiene entre sus principales funciones la defensa del organismo contra la invasión de agentes patógenos. Las células que integran este sistema expresan diversos receptores de membrana, entre ellos los receptores Fc para la IgG (Fc γ R), moléculas que al fijar complejos antígeno-anticuerpo desencadenan la inmunofagocitosis, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, reacción inflamatoria, entre otras funciones. Debido a su importancia biológica, la expresión y modulación de los Fc γ Rs ha sido ampliamente estudiada en células maduras, sin embargo, existen pocos datos al respecto en células hematopoyéticas primitivas como las células 32D de ratón. Recientemente se ha mostrado que la IL-1 β y el IFN- γ incrementan la expresión de Fc γ Rs en membrana en las células 32D, observado a través de la técnica de formación de rosetas; sin embargo, se desconoce el tipo de Fc γ R expresado. Con el propósito de aclarar esta incógnita, el presente trabajo evaluó la expresión de ARNm para el Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII en las células 32D tratadas con las citocinas IL-1 β , IFN- γ y TNF- α . Se encontró que las células 32D no estimuladas expresan ARNm para los tres tipos de Fc γ Rs. Por otra parte, bajo nuestras condiciones de estudio y después de la adición de IFN- γ , TNF- α e IL-1 β , se mostró que mientras la expresión del Fc γ RI y el Fc γ RIII se muestra sin cambios, la expresión del Fc γ RII es modulada diferencialmente: el IFN- γ estimula fuertemente la expresión de la isoforma Fc γ RIIb1 y Fc γ RIIb2, mientras que el estímulo de TNF- α induce la isoforma Fc γ RIIb2 pero inhibe a la isoforma Fc γ RIIb1, a diferencia de la IL-1 β que sólo induce parcialmente ambas isoformas. Nuestros resultados sugieren que las citocinas empleadas tienen una ruta de activación independiente para inducir la expresión de ARNm para el Fc γ RII

Actualmente, se sabe que una disminución en los niveles de este receptor conduce al desarrollo de enfermedades autoinmunes, inflamatorias e inmunohematológicas; así, el hecho de que nuestros resultados muestran que el Fc γ RII es inducido por las citocinas IL-1 β , TNF- α , e IFN- γ , sugiere que estas citocinas podrían probablemente ayudar a restablecer la expresión de este receptor para eliminar los efectos de los cuadros patológicos mencionados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN .

Una de las formas de proteger al organismo contra la invasión de agentes patógenos es a través de la cooperación entre los mecanismos humoral y celular del sistema inmune, al interactuar complejos antígeno-anticuerpo con las células Inmunoefectoras mediante los receptores para la fracción cristalizable de las inmunoglobulinas (FcR) (Ravetch et al, 1986). Existen cinco tipos de inmunoglobulina (Ig): IgG, IgA, IgM, IgE e IgD las cuales poseen receptores Fc específicos para cada tipo de inmunoglobulina, entre estos el grupo más grande corresponde a los receptores para la fracción cristalizable de la Inmunoglobulina G (Fc γ R) (Flores-Borja et al, 1998).

Los receptores Fc γ R de acuerdo a su función se dividen en dos grupos: activadores (como el Fc γ RI y el Fc γ RIII) e inhibidores (como el Fc γ RII) de señalización celular de la región citoplásmica y/o sus cadenas asociadas. Generalmente los receptores que activan o inhiben las señales celulares se encuentran coexpresados en una misma célula estableciendo así un balance entre ambas respuestas, donde el comprometimiento de ambas vías de señalización determina la magnitud de las respuestas de las células efectoras (Ravetch & Bolland, 2001; Salmon & Pricop, 2001).

Cuando se altera este balance entre receptores activadores e inhibidores de respuestas celulares, se desarrolla un cuadro inflamatorio asociado a enfermedades autoinmunes e inmunohematológicas, en el cual se encuentra altamente expresado el Fc γ RIII (Radeke et al, 2002). Es por ello que actualmente se ha despertado la inquietud por conocer los mecanismos que modulan a las moléculas como el Fc γ RII, capaces de frenar tal respuesta inflamatoria ya sea a través de la utilización de citocinas, sus bloqueadores, receptores antagonistas u otras moléculas con fines de uso terapéutico en dichas enfermedades (Clynes et al, 1999; Radeke et al, 2002; Trindandapani et al, 2002; Robbins et al, 2003). El presente trabajo analiza la inducción a la expresión de ARNm de los Fc γ Rs en células primitivas hematopoyéticas tratadas con citocinas, ya que a partir de éstas se generan los diferentes linajes mieloides, y un condicionamiento temprano en la expresión de Fc γ R puede ayudar a restituir el balance perdido entre receptores inflamatorios y anti-inflamatorios en las enfermedades autoinmunes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MARCO TEÓRICO.

RECEPTORES Fc PARA LA INMUNOGLOBULINA G.

Los Fc γ Rs son glicoproteínas expresadas generalmente en células del sistema inmune, cuya función principal es la de fijar y eliminar complejos antígeno-anticuerpo y unen la respuesta inmune humoral y celular ya que sirven de puente entre la especificidad del anticuerpo y la función de la célula efectora. Así, los Fc γ Rs actúan como moléculas que desencadenan las actividades inflamatorias, citolíticas, alérgicas (hipersensibilidad), endocíticas y fagocíticas de las células inmunoefectoras. Además debido a que muchas de las células que poseen Fc γ Rs también son presentadoras de antígenos, la internalización mediada por Fc γ Rs también conduce a presentación de antígenos y amplificación de la respuesta inmune; dichas funciones de los Fc γ Rs estarán relacionadas a la activación y regulación de la defensa inmune en varias condiciones de enfermedad (Deo et al, 1997; Ravetch, 2001).

La mayoría de los Fc γ Rs de humano y de ratón pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas y actualmente se consideran agrupados en dos clases generales de Fc γ Rs de acuerdo a su estructura y función: los de activación de respuestas celulares, caracterizados por la presencia de un segmento de activación a base de tirosina (ITAM) citoplásmico asociada al receptor; y los de inhibición de dichas respuestas caracterizados por la presencia de segmento de activación a base de tirosina (ITIM) (Pricop et al, 2001, Ravetch & Bolland, 2001)(Figura 1).

Dentro de los receptores de activación se encuentra el Fc γ RI (CD64), el cual es una glicoproteína de 72 kilodaltones (kDa) para el receptor humano y de 70 KDa para el receptor murino (Gessner et al, 1998) considerada de alta afinidad por su capacidad para unir IgG monomérica y en menor proporción IgG agregada tanto de humano como de ratón con una constante de asociación (Ka)= $10^7 - 10^8 \text{ M}^{-1}$, y característica de células del linaje monocito-macrófago. La expresión constitutiva del Fc γ RI ocurre en niveles relativamente bajos, de 4 mil a 15 mil receptores por célula, expresión que puede incrementarse de 50 a 150 mil en células activadas (Guyre et al, 1983).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

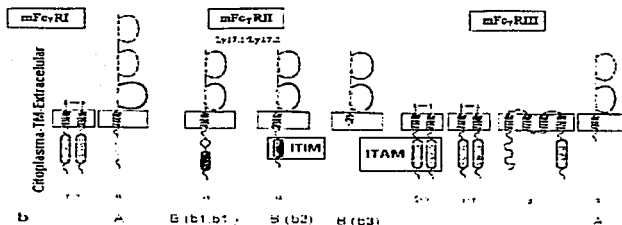


Figura 1. Representación esquemática de los miembros de la familia de los Fc γ R murinos. Algunos Fc γ Rs contienen dos o tres dominios extracelulares similares a inmunoglobulina (óvalos) ligados por enlaces disulfuro. Los dominios citoplásmicos de los Fc γ Rs o sus subunidades asociadas son responsables de la transducción de señales. El Fc γ R1 y Fc γ R11111 son receptores multiméricos que se asocian con secuencias de activación con tirosina (ITAM) rodeados por dímeros de las cadenas gamma o zeta para mediar señales positivas. El Fc γ R1b1, b1', y b2 son receptores inhibitorios de cadena sencilla que contienen secuencias de inhibición con tirosina (ITIM) en sus colas citoplásmicas. La región responsable para la inhibición de la endocitosis está en rombo. TM, transmembranral (Tomado y modificado de Gessner et al, 1998).

En humanos existen tres genes que codifican para este receptor Fc γ RIA, Fc γ RIB y Fc γ RIC localizados en el cromosoma 1 en la banda q21.1, en ratón solo existe un gen el cual se localiza en el cromosoma 3 (Dijsteibloem et al, 2001, Osman et al, 1992; Ravetch, 1994; Hulett & Hogarth, 1994). Para el Fc γ R1 humano (hFc γ R1) se han encontrado cuatro transcritos, el hFc γ R1a, hFc γ R1b1, hFc γ R1b2, hFc γ R1c (Tabla 1), mientras que también se han encontrado variantes genéticas de los receptores hFc γ R11111a, hFc γ R11111b y hFc γ R11111c, producto de una sustitución o intercambio en la posición de un aminoácido, por ejemplo, el hFc γ R11111a tiene dos variantes ocasionadas por una sustitución de Arginina por Histidina en la posición 131 (Dijsteibloem et al, 2001). El hFc γ R1 tiene una homología con el Fc γ R1 de ratón (mFc γ R1) del 75% en sus porciones extracelular y transmembranral, mientras que en la porción citoplásmica solo es del 25% (Sears et al, 1990). Normalmente el hFc γ R1 se expresa en monocito-macrófagos, neutrófilos y eosinófilos tratados con IFN- γ o con factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) (van de Winkel & Capel, 1993). El mFc γ R1 se expresa en condiciones normales en monocitos, macrófagos y neutrófilos. Aún no se han reportado anticuerpos específicos que reconozcan al Fc γ R1 de ratón (Hulett & Hogarth, 1994; Deo et al, 1997).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 1.
CARACTERÍSTICAS DE Fc γ RI (CD64).

Característica	Genes			
	Humano	Humano		Raton
	hFc γ RIA	hFc γ RIB	hFc γ RIC	mFc γ RI
Isoformas	hFc γ Ria	hFc γ Rib1	hFc γ Rib2	mFc γ RI
Alelos	-	-	-	-
Localización en el cromosoma	1q21.1	1q21.1	1q21.1	3
Domínios tipo IgG	3	2	2	3
Forma molecular	TM	TM	S	TM
Cadenas asociadas	γ del Fc γ R	?	?	?
Peso molecular	72	ND	ND	70
Afinidad por IgG (K _a)	10 ⁹ -10 ⁹ M ⁻¹	<10 ⁷ M ⁻¹	ND	10 ⁷ -10 ⁸ M ⁻¹
Especificidad hIgG mlgG	3>1>4>>>2 2a=3>>>1,2b	ND	ND	3>1>4>>>2 2a>>>1,2b,3
Distribución Constitutiva	Monocitos, macrófagos, progenitores mieloides CD34+, células dendríticas	ND	ND	Monocitos, macrófagos, neutrófilos, células mesangicas
Inducida	Neutrófilos, Eosinófilos (IFN- γ , G-CSF), células mesangicas			Células primitivas mieloides, Células leucémicas
Moduladores	(+)IFN- γ , IL-10, G-CSF y TNF- α (en U937) (-)IL-4, IL-13	ND	ND	(-) IFN- γ , (+) IL-1

TM=Transmembranal. S=Soluble ND=No determinado HR=Alta respuesta, LR=Baja respuesta (Tomado y modificado de Hulett & Hogarth, 1994; Gessi et al, 1994; Santiago, 1996; Deo et al, 1997; Flores-Borja et al, 1998; Gessner et al. 1998; Martinez, 2000)

El Fc γ RII (CD32) es una glicoproteína de 40-43 kDa (Gessner et al, 1998) de baja afinidad ya que solo reconoce IgG en forma de complejo o polimérica con una K_a<10⁷ M⁻¹. En el humano se han identificado 3 genes para este receptor hFc γ RIIA, B y C que se localizan en la banda q23-24 del cromosoma 1 y que codifican para 6 diferentes transcritos que son: hFc γ RIIa1, hFc γ RIIa2, hFc γ RIIb1, hFc γ RIIb2, hFc γ RIIb3, y hFc γ RIIc1 (Flores-Borja et al, 1998).

A diferencia del hFc γ RII, para la molécula del mFc γ RII de con 40-60 KDa solo se ha identificado un gen, el mFc γ RIIB, con cuatro transcritos distintos el mFc γ RIIb1 (b1), mFc γ RIIb1' (b1'), mFc γ RIIb2 (b2) y mFc γ RIIb3 (b3) (Hulett & Hogarth, 1994; Tartour et al, 1995; Gessner et al, 1998), de las

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

cuales las proteínas transmembranales b1 y b1' son expresadas en linfocitos B y b2 y b3 en macrófagos (Gessner et al, 1998). En cuanto a su estructura, los transcritos b1 y b2 son idénticas en sus dominios transmembranales y extracelulares, pero difieren en el dominio citoplásmico (Tabla 2), ya que la variante b2 carece de un fragmento intracelular de 47 aminoácidos (exón 8) que posee el Fc γ RIIb1 (Fridman et al, 1992; Gessner et al, 1998). La isoforma Fc γ RIIb1' contiene un inserto de 19 aminoácidos codificado en la parte 5' del primer exón citoplásmico lo cual la convierte en la isoforma homóloga del hFc γ RIIb1. El mFc γ RIIb3 carece de secuencias codificadas por el primer exón intracitoplásmico y el exón transmembranal (Figura 1), liberándose así como moléculas solubles por los macrófagos (Latour et al, 1996; Gessner et al, 1998). El hFc γ RII tiene una amplia distribución ya que se localiza en prácticamente todos los leucocitos a excepción de células NK, mientras que el OmFc γ RII se localiza en monocitos, células cebadas, macrófagos, plaquetas, neutrófilos y células B (Sandor & Lynch, 1993; Hulett & Hogarth, 1994; Deo et al 1997; Gessner et al, 1998).

De particular importancia en las isoformas del Fc γ RII es su capacidad para expresarse diferencialmente, así, la isoforma hFc γ RIIB se expresa principalmente en linfocitos B, monocitos y macrófagos, mientras que las isoformas de los genes hFc γ RIIA y hFc γ RIIC se encuentran en neutrófilos (Hulett & Hogarth, 1994). Estudios posteriores en ratón han mostrado una selectividad más específica en mFc γ RIIB, ya que la isoforma mFc γ RIIb1 y mFc γ RIIb1' se expresan preferencialmente en linfocitos B mientras que la isoforma mFc γ RIIb2 se ubica en macrófagos (Fridman et al, 1992, Bonnerot & Daeron, 1994, Zusman et al, 1996, Gessner et al, 1998). Hasta el momento el anticuerpo clásico que reconoce al Fc γ RII es el anticuerpo monoclonal de rata 2.4G2, que bloquea al sitio de unión de la IgG; además existe otro anticuerpo de ratón capaz de reconocer al mFc γ RII que es el anti-Ly-17.2 que detecta la forma polimórfica Ly-17.2 y también bloquea al sitio de unión de la IgG (Hibbs et al, 1985). Recientemente se han desarrollado anticuerpos monoclonales de humano para la detección del hFc γ RII como 6C4, 2B2, 3D3, y 93.4. Los tres primeros se unen a las isoformas hFc γ RIIA y hFc γ RIIB. Dos de ellos (6C4 y 2B2) permiten un bloqueo completo del

enlace de los complejos inmunes al Fc γ RII. Los anticuerpos 6C4, 2B2, 3D3 se unen al receptor glicosilado o no glicosilado; el anticuerpo monoclonal 93.4 está dirigido contra la región intracelular del Fc γ RIIa1/2 (Vely et al, 1997).

TABLA 2.
CARACTERÍSTICAS DE Fc γ RII (CD32).

Característica	Genes							
	Humano				Ratón			
	hFc γ RIIA	hFc γ RIIB	hFc γ RIIC	mFc γ RIIb1	mFc γ RIIb1*	mFc γ RIIb2	mFc γ RIIb3	
Isoformas	hFc γ RIIa1	hFc γ RIIa2	hFc γ RIIb1, b2, b3	hFc γ RIIc	mFc γ RIIb1	mFc γ RIIb1*	mFc γ RIIb2	mFc γ RIIb3
Alelos	HR, LR		-	-	Ly-17.1, Ly-17.2			
Localización en el cromosoma	1q23-24		1q23-24	1q23-24	1			
Domínios tipo IgG	2		2	2	2			
Forma molecular	TM	S	TM	TM	TM	TM	TM	S
Cadenas asociadas	?		?	?	?			
Peso molecular	40-43		40-43	40-43	40-60			
Afinidad por IgG (K _a)	10 ⁷ M ⁻¹		10 ⁷ M ⁻¹	ND	10 ⁷ M ⁻¹			
Especificidad hIgG	LR 3>1>2>>>4		3>1>4>2*	ND	3>1>2>>>4			
mIgG	HR 3>1>2>>4 LR 2a=2b>>1 HR 2a=1b=1		2a=2b>1	ND	1=2a=2b>>>3			
Distribución Constitutiva	Monocito, Macrófago, Neutrófilo, Plaqueta, células de Langerhans		Monocitos Macrófago Células B Células dendríticas, Basófilos, eosinófilos	Monocito, Macrófago, Neutrófilo, Células B	Monocitos, Células cebadas, Macrófagos, Plaquetas, Neutrófilos, Células B Subpoblación de linfocitos T, Células mesangias, Eosinófilos, basófilos			
Modulación	(+)TNF- α (en células leucémicas y (-) IL-4		(-)IL-4** y (-)IFN- γ (en monocitos y macrófagos**	ND	(-)IL-1, (-) IL-4			

TM=Transmembranal, S=Soluble, ND=No determinado

* Sólo determinado para la isoforma Fc γ RIIb1 **Sólo determinado para Fc γ RIIb2 ***Sólo determinado para Fc γ RIIB

(Tomado y modificado de Zimmer & Jones 1990, Hulett & Hogarth, 1994, de Andres et al, 1994; Deo et al, 1997; Flores-Borja et al, 1999; Pan et al, 1995; Gessner et al, 1998; Pricop et al, 2001; Santiago, 1996; Martínez, 2000).

El receptor Fc γ RII inhibitorio bloquea los receptores que desencadenan la activación celular (como el Fc γ RI y Fc γ RIII) a través de la activación y fosforilación de cinasas de tirosina, una de sus

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

funciones es bloquear la entrada de calcio extracelular a la célula, lo cual determina la inhibición de la proliferación de los linfocitos B y la secreción de anticuerpos (Muta et al, 1994; Takai et al, 1996). Además se ha logrado definir la participación de dos de las isoformas del mFc γ RIIB, en estudios en linfocitos B de ratón y células leucémicas transfectadas de rata, encontrándose que la isoforma mFc γ RIIb1 participa en la inhibición de la liberación de factores como serotonina, leucotrienos y TNF- α , además de inhibir la producción de IL-2, la fagocitosis, endocitosis y la presentación de antígenos; en contraste, el mFc γ RIIb2, es activador de los procesos de fagocitosis, endocitosis y presentación de antígenos (Bonnerot & Daeron, 1994).

El hFc γ RIII (CD16) es una glicoproteína de 72 kDa (Gessner et al, 1998) clasificado como receptor de activación de la respuesta inmune. Para este receptor se han identificado dos genes codificantes localizados en el cromosoma 1 en la banda q23-24, el Fc γ RIIIA y el Fc γ RIIIB los cuales presentan dos transcritos; el Fc γ RIIIa transmembranal que une IgG monomérica y agregada en macrófagos y células NK, y el Fc γ RIIIb con un anclaje de glicosilfosfatidilinositol que presenta baja afinidad por IgG monomérica en linfocitos (Flores-Borja et al, 1998) y que se expresa también en neutrófilos y eosinófilos. En ratón sólo se ha identificado un gen, el mFc γ RIII que codifica para una proteína transmembranal glicosilada de 40-60 KDa (Gessner et al, 1998 (Tabla 3).

Entre las funciones del Fc γ RIII de ratón se encuentra su participación en la señalización temprana para el desarrollo de linfocitos T y células NK, mediante su interacción con un ligando aún no bien caracterizado (Mellman et al, 1988). Se sabe que el Fc γ RIII juega un papel importante en la alergia tipo II y III (Claynes & Ravetch, 1995; Hazenbos et al, 1996); además, se sabe que la traducción de señales inducida por el Fc γ RIII activa la fosfolipasa C- γ 1 (PLC- γ 1), lo que conduce a la hidrólisis del fosfatidilinositol y la producción de diacilglicerol, procesos importantes en la cascada de señalización (Ting et al, 1992). No existe hasta el momento un anticuerpo específico para el mFc γ RIII, sin embargo, el anticuerpo 2.4G2 de rata funciona para detectarlo. En humano se utiliza el anticuerpo monoclonal 7.5 4 que se une a las isoformas Fc γ RIIIa y RIIIB (Vely et al, 1997).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 3.
CARACTERÍSTICAS DE Fc γ R/III (CD16).

Característica	Génes		
	Humano		Ratón
Isoformas	hFc γ R/IIIA hFc γ R/IIIA	hFc γ R/IIIB hFc γ R/IIb	mFc γ R/III mFc γ R/III
Alelos		NA1/NA2	
Localización en el cromosoma	1q23-24	1q23-24	1
Domínios tipo IgG	2	2	2
Forma molecular	TM	Unión GPI*	TM
Cadenas asociadas	γ del Fc ϵ R	-	γ del Fc ϵ R
Peso molecular	50-80	50-80	40-60
Afinidad por IgG (K _a)	2X10 ⁻⁷ M ⁻¹	<10 ⁷ M ⁻¹	10 ⁷ M ⁻¹
Especificidad hIgG mIgG	ND 3>2a>2b>>1	1=3>>>2=4 3>2>2b>>1	3=1>2>4 1=2a=2b>>>3
Distribución Constitutiva	Macrófagos, Células Nk, Células T $\gamma\delta$, monocitos	Neutrófilos,	Macrófagos, Células Nk, Células T $\gamma\delta$, células cebadas, neutrófilos
Inducida	Células mesangicas, monocitos	Eosinófilos (IFN- γ)	Eosinófilos
Modulación	(+) TGF- β (Monocitos) e IFN- γ (-) IL-4, IL-1	(+) IFN- γ , GM-CSF, G-CSF (-) TNF- α (Neutrófilos)	(+) IFN- γ , GM-CSF e IL-1 (-) IL-4 (en eosinófilos)

TM=Transmembranal, S=Soluble, ND=No determinado

* Unión Glucosilfosfatidilinositol

(Tomado y modificado de Rossman et al. 1993, Hulett & Hogarth, 1994, de Andres et al. 1994; Deo et al. 1997; Flores-Borja et al. 1998, Pan et al. 1998, Gessner et al. 1998)

FUNCIÓN DE LOS Fc γ Rs.

Los Fc γ Rs juegan un papel importante en la inmunidad y resistencia a las infecciones. Su diversidad y distribución selectiva les permiten mediar diferentes respuestas, que van desde funciones efectoras típicas hasta respuestas más específicas a saber:

El Fc γ R/I participa en funciones como la endocitosis, la presentación de antígenos citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), la fagocitosis, el estallido respiratorio (oxidantes reactivos), y es mediador de inflamación. El Fc γ R/II realiza la endocitosis, presentación de antígenos, estallido respiratorio, fagocitosis, capping, inhibición de la activación de los linfocitos B y células cebadas, apoptosis. El Fc γ R/III efectúa la endocitosis, presentación de antígenos, CCDA, apoptosis, fagocitosis, liberación de mediadores, estallido respiratorio, producción de IL-2,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

liberación de serotonina, leucotrienos y $\text{TNF-}\alpha$ en células leucémicas y células B (Bonnerot & Daeron, 1994; Gessner et al, 1998) (Figura 2).

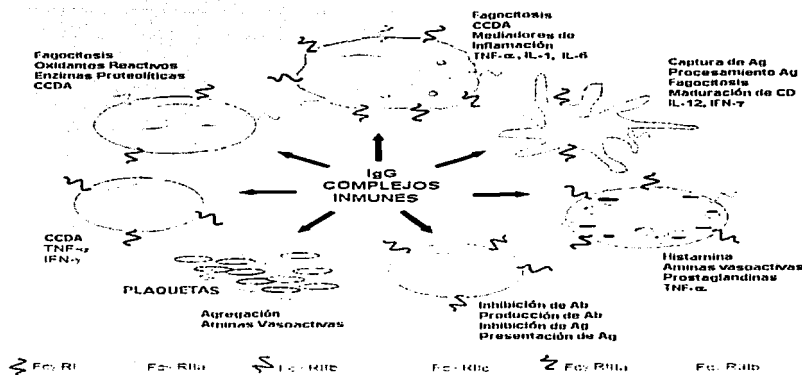


Figura 2. Distribución celular y Funciones de los $\text{Fc}\gamma\text{Rs}$. Leucocitos polimorfonucleares (PMN), monocitos y macrófagos (MO), células dendríticas (DC), células cebadas (MC), linfocitos B (B), plaquetas, y células asesinas naturales (NK). CCDA: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. $\text{TNF-}\alpha$: Factor de Necrosis Tumoral alfa, IL-1: Interleucina 1, Ag: Antígeno, $\text{IFN-}\gamma$: Interferón gamma. Ab: anticuerpo. IL-12: Interleucina 12, IL-6: Interleucina 6 (Tomado y Modificado de Salmon & Niscomp, 2001)

Los receptores que desencadenan la activación de señales están asociados a una molécula que contiene un segmento (ITAM) el cual al ser fosforilado provoca el reclutamiento de cinasas activadoras (Syk, PTK), moléculas proteicas que inducen una amplia variedad de respuestas. En contraste, los receptores inhibidores que abaten las respuestas inmunes poseen intracelularmente un segmento de inhibición a base de tirosina (ITIM), el cual es desfosforilado induciendo un reclutamiento de fosfatasas inhibitoras (SHP, PTP) (Regueiro & López, 1996; Cassard et al, 2002) (Fig 3).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

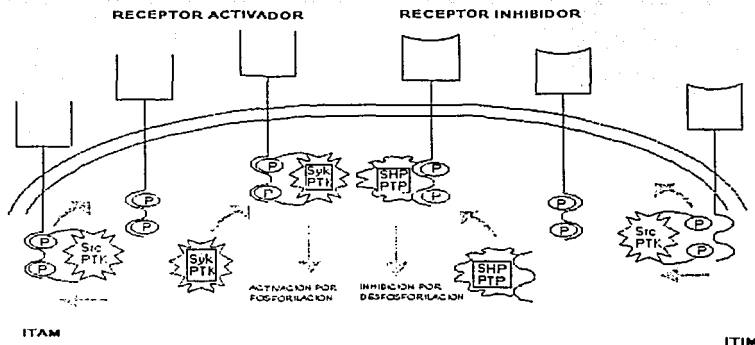


Figura 3. Las señales activadoras e inhibitoras inducidas por las moléculas ITAM e ITIM de varios receptores cumplen en el citoplasma en equilibrio. Las fosfo-ITAMs reclutan cinasas activadoras (Syk PTK), las fosfo-ITIMs reclutan fosfatasa inhibitoras (SHP PTP). Tomada y modificada de Regueiro & Lopez, 1996.

La forma en que se desencadena la señalización por $Fc\gamma R$ s se realiza en dos pasos principales. El primer paso en la activación de $Fc\gamma R$ es el entrecruzamiento del receptor con el complejo antígeno-anticuerpo, en el cual es necesaria la presencia de al menos dos receptores entrecruzados para desencadenar la cascada de señalización, ya sea de inhibición o de activación. El entrecruzamiento en el dominio de enlace al ligando $Fc\gamma R$, así como fuera de este dominio (vía anticuerpos monoclonales anti-receptor) activan la función de $Fc\gamma R$ (van de Winkel & Capel, 1993; Wallace et al. 1994)

El segundo paso involucra la fosforilación de residuos de tirosina en la región ITAM de los $Fc\gamma R$ s por la familia Src de cinasas de proteínas con especificidad por tirosinas (PTKs), lo que conduce a la asociación y activación de la familia de tirosina cinasas Syk de PTKs con la ITAM fosforilada que conduce a la activación celular, por otro lado el segundo paso puede involucrar también defosforilación de residuos de tirosina en la región ITIM de los $Fc\gamma R$ s reclutando en este caso fosfatasa inhibitoras (SHP, PTP) que desencadena la inhibición celular (Regueiro & Lopez, 1996) (Figura 3) Aunque los eventos subsiguientes no están claramente delineados, existen evidencias

que involucran varios componentes de señalización distintos que conducen a diferentes respuestas biológicas. De esta manera, las células que expresan Fc γ Rs y que son activadas vía ésta cascada de señalización, son capaces de lisar y/o fagocitar o pinocitar patógenos y células tumorales opsonizados con IgG (van de Winkel & Capel, 1993).

LOS Fc γ Rs Y LA ENFERMEDAD.

Recientemente aumentó el interés por el estudio de los Fc γ Rs debido a que se ha demostrado su participación en mecanismos relacionados con la regulación de la respuesta inmune; además se ha establecido que variaciones genéticas o alteraciones en los niveles de expresión de los Fc γ Rs están implicadas en alteraciones de la defensa del huésped y en enfermedades autoinmunes e inmunohematológicas. Por ejemplo, en el caso particular de las infecciones por patógenos, se ha encontrado que el virus del dengue infecta solo a células Fc γ R⁺ del linaje mononuclear, de manera que la tasa de infección aumenta cuando estas células entran en contacto con virus cubiertos por anticuerpos, lo que implica al Fc γ RII en la infección (Flores-Borja et al, 1998). También se ha observado que los Fc γ Rs participan en la defensa inmune contra patógenos intracelulares como *Toxoplasma gondii*, gracias a la formación de anticuerpos biespecíficos para este patógeno que lo destruyen, pues conducen a la célula efectora a través de la unión con los Fc γ Rs. Estos anticuerpos biespecíficos se basan en la afinidad exclusiva del Fc γ RIII de *T. gondii*, marcando por un lado al patógeno contra el Fc γ R y a través de éste dirigirlo hacia la célula efectora por excelencia en este caso, las células NK (Erbe et al, 1991).

Por otro lado, una disminución en la expresión del Fc γ RII y Fc γ RIII se correlaciona con un mayor riesgo a contraer infecciones en pacientes neutropénicos (Kant et al, 1995). Además, en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) se ha relacionado la progresión de la enfermedad con alteraciones en la expresión de Fc γ Rs, ya que en casos de pacientes VIH⁺ infectados por microorganismos oportunistas se ha observado una sobreexpresión del Fc γ RIII (Roederer et al, 1996; Dunne et al, 1996). Así, se ha propuesto a los Fc γ Rs como moléculas que introducen complejos inmunes que contienen VIH para infectar linfocitos o monocitos y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

macrófagos, aunque en este último caso los Fc γ Rs no son infectivos, sino que más bien aumentan el contacto de la célula con el virus, contribuyendo así a la infección (Garcla et al, 1996; Takeda et al, 1988).

También se ha observado el papel de los Fc γ Rs en las enfermedades inflamatorias, pues se ha demostrado que los neutrófilos activados son los responsables del daño tisular en enfermedades intestinales inflamatorias, ya que después de ser activados liberan Fc γ R1Ib solubles e incrementan la concentración de este receptor en fluidos intestinalcc. el cual produce signos histológicos de inflamación de las mucosas intestinales (Hommes et al, 1996). En otras enfermedades inflamatorias como nefritis, y alveolitis, se han encontrado bajos niveles del Fc γ R1I y alta presencia del Fc γ R1II, conocido receptor inflamatorio, demostrando una vez mas la interrelación que existe entre los receptores, por lo cual postulan como una terapia la manipulación de los niveles del Fc γ R1I. En enfermedades autoinmunes como trombocitopenia inducida por heparina, existe un aumento de la expresión del Fc γ R1I que participa en la patogénesis de la trombosis (Radeke et al, 2002; Clynes et al, 1999; Chong et al, 1993). Los Fc γ Rs, junto con otras moléculas y algunos componentes del sistema del complemento, células cebadas y neutrófilos, juegan un papel importante en los procesos inflamatorios que conducen a hemorragia, edema y daño tisular, síntomas característicos de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso y la artritis reumatoide (Takai et al, 1996, Silvestre & Ravetch, 1994)

En el lupus eritematoso sistémico, caracterizado por la acumulación de complejos inmunes, se ha encontrado que los Fc γ Rs presentes en las células de pacientes con esta enfermedad no son funcionales. Incluso la enfermedad se caracteriza por una ausencia del Fc γ R1II en los granulocitos correlacionado con el padecimiento renal (Flores-Borja et al, 1998; Szucs et al, 1995). Así, las evidencias hasta ahora obtenidas muestran un papel más importante en el desarrollo de estas enfermedades que el que juegan las moléculas del complemento (Wallace et al, 1994; Deo et al, 1997; Dijkstra et al, 2001).

En cuanto a la inmunología tumoral, experimentos realizados en ratón han demostrado que el Fc γ R1Ib1 está involucrado en el desarrollo de tumores, ya que este actúa como factor de progresión cuando se expresa ectópicamente en células tumorales no linfoides, aunque el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

mecanismo por el que se lleva a cabo aún no se define (Zusman et al, 1996). Por otro lado, estudios en humano han demostrado que el Fc γ RIII soluble puede ser considerado como un marcador predictivo o de diagnóstico, ya que estudios en pacientes con mieloma múltiple muestran una expresión disminuida, mientras que la expresión del Fc γ RII está un poco aumentada (Tartour et al, 1995).

También se ha demostrado que los Fc γ Rs juegan un papel muy importante en la CCDA, pues se ha visto que el reconocimiento del Fc γ RI por un anticuerpo biespecifico, que además reconoce al antígeno HER-2/neu (el cual está sobreexpresado en células tumorales de mama u ovario) puede activar a monocitos y macrófagos para la eliminación de las células tumorales. Además, estudios en ratón han demostrado que el Fc γ RIII también es una buena opción para la fabricación de anticuerpos terapéuticos para el caso de cáncer de pulmón (Valone et al, 1995; Clynes et al, 2000).

MODULACIÓN DE LOS Fc γ Rs .

Debido a todas estas actividades que desempeñan los Fc γ Rs, resulta interesante la posibilidad de modular la expresión de los mismos para restablecer el correcto funcionamiento y el balance entre los receptores con el fin de evitar cuadros patológicos como los descritos anteriormente. Es por esa razón que durante los últimos años ha habido un gran interés en evaluar el efecto de algunas citocinas sobre la expresión de los receptores Fc γ R.

Así, los estudios realizados se han enfocado principalmente en humano, donde citocinas como el IFN- γ inducen la expresión del Fc γ RI en células U937 (Gessi et al, 1994), células cebadas (Okayama et al. 2001), neutrófilos, eosinófilos y monocito-macrófagos (van de Winkel & Capel, 1993), y la inducción del Fc γ RII y el Fc γ RIII en células endoteliales de la aorta humanas (Pan et al, 1998); también aumenta la isoforma Fc γ RIIIa en macrófagos peritoneales (Zimmer & Jones, 1990), aunque en monocitos (Weinshank et al, 1988) y macrófagos peritoneales disminuye la isoforma Fc γ RIIb (Backman & Guyre, 1994) e inhibe la fagocitosis dependiente de anticuerpo en macrófagos (Liao & Simon, 1994).

TESIS CON
FALLA DE CALIBRE

El hFc γ R1IIA también es inducido por el TGF- β en monocitos, mientras que el IFN- γ , el GM-CSF y el G-CSF son inductores del hFc γ R1IIB (Hulett & Hogarth, 1994). La IL-4 participa como un inhibidor del Fc γ R1IA (Hulett & Hogarth, 1994), aunque provoca un incremento de la expresión de Fc γ Rs particularmente de la isoforma Fc γ R1Ib2 en monocitos (Pricop et al, 2001). Por otro lado, el TNF- α también induce un incremento en la expresión del Fc γ R1 en células U937 (Gessi et al, 1994), al igual que para el Fc γ R1I en células endoteliales de la aorta (Pan et al, 1998) y para la isoforma Fc γ R1IA en células WEHI-3, aumentando 2.5 veces el nivel basal (Zimmer & Jones, 1990), mientras que en neutrófilos el TNF- α inhibe al hFc γ R1IIB (Hulett & Hogarth, 1994). La IL-1 disminuye al Fc γ R1III a nivel de proteína al igual que disminuye la fagocitosis debida a este receptor (Liao & Simon, 1994).

Los estudios realizados en ratón son más limitados. Sin embargo, en cuanto a la modulación de los Fc γ Rs, los trabajos existentes muestran que el IFN- γ induce considerablemente la expresión del Fc γ R1 en macrófagos (Sivo et al, 1993; Wu et al, 1996), y el Fc γ R1I de eosinófilos a nivel de proteína, en contraste, la IL-4 inhibe la expresión de ARNm del Fc γ R1I y Fc γ R1III (de Andres et al, 1994). También se sabe que la IL-1 induce un incremento en la formación de rosetas, y por lo tanto de Fc γ Rs en células leucémicas (Santiago, 1996).

En el caso particular del Fc γ R1III, el IFN- γ induce su expresión en células RAW 264.7 y J774a a nivel de ARNm y proteína (Weinshank et al, 1988, Radeke et al, 2002), así como en macrófagos donde aumenta 1.5 veces su expresión (Sivo et al, 1993) y en eosinófilos aumenta también los niveles basales a nivel de proteína (de Andres et al, 1994). Por otro lado, el GM-CSF induce la expresión de ARNm y proteína del Fc γ R1III en eosinófilos de ratón (de Andres et al, 1994).

En los párrafos anteriores se muestran los efectos de diversas citocinas en la modulación de la expresión de los Fc γ R1, Fc γ R1I y Fc γ R1III en células maduras. Actualmente se sabe muy poco sobre la modulación de los receptores en células primitivas. Hasta el momento se ha observado la presencia de proteína de los tres Fc γ Rs en células CD34+: sin embargo, no son funcionales ya que no conducen a macropinocitosis o fagocitosis (Kolb-Maüer et al, 2002). Se ha mostrado que progenitores mieloides humanos CD34⁺ y células dendríticas expresan el receptor Fc γ R1 (CD64)

(Deo et al, 1997); por otro lado, algunos estudios consideran que la presencia del Fc γ RI en células CD34⁺ es un indicador de diferenciación hacia el linaje granulomonocítico, debido a que se induce el Fc γ RI a medida que la célula pierde su multipotencialidad (Olweus et al, 1995).

También en células progenitoras de mastocitos se ha localizado la expresión del Fc γ RIII (Lobell et al, 1993) y en la línea celular primitiva FDC-P2/185-4 de ratón, dependiente de IL-3, se demostró que el Fc γ RIII activado es responsable de la inhibición de la apoptosis, ocasionada por la falta de IL-3, aumentando la producción autocrina de esta citocina (Yoshikawa et al, 1996), induciendo los niveles del receptor antiapoptótico CD95 y favoreciendo el crecimiento celular (Yoshikawa et al, 1997). Estudios recientes muestran un incremento en la expresión de rosetas en células primitivas mieloides 32D por efecto de la IL-1 β , e IFN- γ (Martínez, 2000), lo cual indica un aumento a nivel de membrana debido a la citocina, también se ha mostrado que la IL-1 β inhibe la proliferación de las células 32D mediante un mecanismo que consiste en la inducción de ARNm y proteína bioactiva de TNF- α (Ledesma 2002), que se piensa podría participar en la inducción de rosetas inducida por IL-1 β . Resumiendo, las típicas citocinas moduladoras de Fc γ Rs en células primitivas de ratón son principalmente la IL-1 β , e IFN- γ , y el TNF- α .

Interleucina-1.

Interleucina-1 es una molécula glicoprotéica que posee un amplio espectro de propiedades inflamatorias, metabólicas, fisiológicas, hematopoyéticas e inmunológicas (Dinarello 1991). Existen dos formas biológicas la interleucina-1 alfa (IL-1 α) y la interleucina-1 beta (IL-1 β), ambas formas se unen al mismo receptor y, por lo tanto, tienen la misma actividad biológica, a pesar de que muestran una homología muy baja en la secuencia de aminoácidos (20 a 30%), sin embargo existe un alto grado de conservación de secuencias (entre 75 y 78%) entre especies, de manera que no es especie-específica (Schindler & Dinarello 1990)

Existe otra molécula similar a la IL-1 que se une al mismo receptor, pero esta no despierta ninguna actividad biológica, debido a estas características se le ha dado el nombre de antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1ra). Estas tres moléculas constituyen la familia de la IL-1, aunque recientemente se agregan otras dos moléculas relacionadas, conocidas como interleucina-1 delta

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(IL-15), e interleucina-1 epsilon (IL-1 ϵ), en tejido embrionario y células epiteliales. La IL-15 muestra una alta homología con IL-1ra y tiene la característica de inhibir la activación del factor de transcripción NF- κ B, inducida por parte de la IL-1 ϵ (Debets et al, 2001).

El gen para la IL-1 β es de 7 kb (Clark et al, 1986), este gen en el humano, está localizados en el cromosoma 2 en la posición 2q13, en la misma región que IL-1ra y los receptores del tipo I y tipo II para la IL-1 (Lafage et al, 1989). Los genes para IL-1 codifican para una proteína precursora (pro-IL-1) de 31 kDa, que es cortada por enzimas proteolíticas para generar las formas maduras de 17 kDa. A diferencia de la pro-IL-1 α que es biológicamente activa, la pro-IL-1 β es sólo parcialmente activa y debe ser cortada por una enzima específica conocida como enzima convertidora de la IL-1 β (ICE) (Billiau et al, 1986; Hoang et al, 1988; Hamblin 1993). IL-1 α es una proteína preferentemente enlazada a membrana mientras que la IL-1 β es una proteína de secreción, siendo por tanto la forma predominante de la IL-1, en el sobrenadante de los cultivos y fluidos corporales (Dinarello 1991).

Se considera como fuentes principales de IL-1 a las células del tipo monocito-macrófago, sin embargo se ha demostrado que prácticamente todos los tipos celulares pueden producir IL-1 bajo las condiciones adecuadas. De esta manera, entre los tipos celulares identificados como productores de esta molécula están los neutrófilos, los astrocitos, los linfocitos T y B, los fibroblastos, los queratinocitos, las células NK, sinoviales, epiteliales, dendríticas, endoteliales, musculares y células de la microglia (Oppenheim, 1986)

La interleucina-1 es un elemento importante en el mantenimiento de la homeostasis, tanto por el número tan vasto de células sobre las que actúa, como por estar vinculada a una amplia variedad de procesos metabólicos, que regulan básicamente a los sistemas inmune, neuroendócrino y neuroinmune (Dinarello 1996; Alheim & Bartfalí 1998). La mayoría de los efectos de la IL-1 (Tabla 4) son mediados por la inducción de otras citocinas, tales como la interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), TNF, IFN (Fibbe & Falkenburg 1989)

TESIS CON
FALLA DE URGEN

Tabla 4.
Efectos biológicos de la IL-1.

Sistema nervioso central	Induce fiebre, sueño, anorexia y liberación de neuropéptidos.
Metabolismo.	Incrementa la síntesis de proteínas de fase aguda. Eleva los niveles de Zn y Fe en el suero. Incrementa la síntesis de insulina y excreción de Na.
Sistema vascular.	Induce hipotensión y shock. Incrementa la adherencia de leucocitos. Disminuye la resistencia vascular.
Efectos inmunológicos.	Activa células NK en sinergismo con IL-2 e IFN. Activa a linfocitos T para la síntesis de IL-2. Sinergiza con IL-4 para producir IL-6 que activa a linfocitos B. Incrementa la expresión de receptores para IL-2. Incrementa la citotoxicidad de macrófagos. Induce la quimiotaxis de linfocitos T y B.
Efectos inflamatorios.	Induce la síntesis de colágena y procólagenasa. Induce la liberación de histamina por basófilos. Induce la degranulación de neutrófilos y la liberación de tromboxanos por monocitos. Aumenta la expresión de moléculas de adhesión.
Efectos de tejido vascular.	Induce la actividad procoagulante de células endoteliales. Incrementa la adhesividad de células endoteliales.
Efectos en hematopoyesis.	Induce la producción de GM-CSF, G-CSF, M-CSF e IL-3 en células estromales de médula ósea. Aumenta la supervivencia in vitro y protege a las células precursoras hematopoyéticas de agentes citotóxicos. Sinergiza con IL-3, IL-6, G-CSF y M-CSF para regular la proliferación y diferenciación de células tallo hasta colonias específicas de un linaje determinado. Estimula directamente la producción de plaquetas. Induce la expresión de receptores Fc en células mieloides. Inhibe la hematopoyesis.

(Tomada de Martínez 2000).

Se reconoce que la IL-1 participa en la proliferación de células hematopoyéticas, induciendo la producción de citocinas (Ruscetti et al, 1992) y factores de crecimiento por las células estromales de médula ósea (Dinarello 1994). Además favorece la supervivencia y proliferación de las células precursoras hematopoyéticas, con lo cual facilita la recuperación de ratones irradiados letalmente (Dinarello 1994; Fibbe & Faikenburg 1990; Jovicic et al, 1996; Kennedy & Borch 1999; Snoeck et al, 1994). Se sabe de su participación en la proliferación de varios tipos de leucemias, de su capacidad para otorgar un efecto radio y quimio protector a las células hematopoyéticas (Moreb & Zucalli 1992) y el efecto sinérgico con otros factores para favorecer la proliferación de precusores mieloides (Dinarello 1996).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sin embargo también existen algunos reportes que indican que la IL-1 inhibe la proliferación de la línea leucémica de ratón M1, así como de la línea mielóide humana K562 (Onozaki et al, 1985; Lovett et al, 1986); se le reconoce como una citocina reguladora de la proliferación de células de leucemia aguda (AML) e inhibidora de la proliferación de macrófagos inmortalizados con retrovirus hasta en un 25% (Carter et al, 1992).

Es conocido que la combinación de factor estimulador de células tallo (SCF), IL-6, interleucina-11 (IL-11) y EPO favorece la multiplicación de los progenitores mieloides totipotenciales, pero la adición de IL-3 o IL-1 (alfa o beta) suprime la producción de unidades formadoras de colonias en cultivo (Yonemura et al, 1996); además, recientemente se demostró que la IL-1 β inhibe la proliferación de las células 32D de ratón (Martínez 2000), una línea mielóide multipotencial dependiente de IL-3, ampliamente usada como modelo de estudio de la hematopoyesis normal (Boosalis et al, 1997; Sanchez et al, 1998).

Existen reportes de que altas dosis de IL-1 inducen la producción de TNF- α (Dinarello 1996; Ikejima et al, 1990; Gasparetto et al, 1989) el cual puede suprimir la formación de colonias (Ware et al, 1992) y recientemente se demostró que células CD34+ humanas expresan de manera constitutiva el gen para el TNF- α (Majka et al, 2001).

Factor de Necrosis Tumoral alfa.

Este término se refiere a dos citocinas, codificadas por genes distintos, conocidas como factor de necrosis tumoral alfa o cachectina (TNF- α) y factor de necrosis tumoral beta o linfotóxina (TNF- β). Ambas citocinas interactúan con los mismos receptores de membrana y están implicadas en la respuesta del organismo contra algunas enfermedades (Tracey & Cerami 1994).

El gen para el TNF- α codifica para una pro-hormona que accesa a la membrana celular como un polipéptido de 26 kDa (Kriegler et al, 1988; Perez et al, 1990; Jue et al, 1990), esta forma enlazada a membrana es bioactiva y está implicada en las actividades parácrinas del TNF- α en diversos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

tejidos. En respuesta a endotoxinas bacterianas por ejemplo lipopolisacárido (LPS) y otros estímulos, la forma precursora es cortada por enzimas proteolíticas para generar la forma madura de 17 kDa (Pennica et al, 1984; Davis et al, 1987). Tres de estas formas monoméricas se asocian de manera no-covalente para formar un trímero, que es la forma bioactiva del TNF- α predominante en suero y fluidos corporales (Smith & Baglioni 1987; Jones et al, 1989).

Originalmente se consideraba que el TNF- α era exclusivamente producido por monocitos y macrófagos (Lange 1992; Lejeune et al, 1998), sin embargo se ha observado, al menos in vitro, que muchos tipos celulares son capaces de sintetizar TNF- α (Sidhu & Bollon 1993), entre estos: las células de leucemia promielocítica aguda, timocitos, linfocitos T y B, células NK, fibroblastos (Bharat & Jordan 1992; Hamblin 1993) y otros tipos celulares en respuesta a toxinas bacterianas, productos inflamatorios e infecciones por *Pseudomona aeruginosa*, *Francisella tularensis* y *salmonela* (Cole et al, 1999; Stenmark et al, 1999; Ciacci-Woolwine et al, 1997).

El TNF- α muestra una amplia gama de efectos biológicos que en general, no son especie-específicos (Aiyer & Aggarwal 1988). Su principal actividad in vivo, se refiere a la citotoxicidad sobre células tumorales que varía dependiendo de las condiciones de crecimiento y el grado de diferenciación (Kirstein et al, 1986), en estudios in vitro actúa selectivamente sobre líneas celulares transformadas, no teniendo efecto sobre células normales en cultivo salvo ciertas excepciones en las que, bajo condiciones en particular inhibe la proliferación de fibroblastos, células endoteliales, adipocitos y queratinocitos (Sugarman et al, 1985; Fransen et al, 1986).

Dependiendo de la célula blanco y de la presencia de inhibidores metabólicos, el TNF- α puede inducir necrosis o muerte por apoptosis (Schmid et al, 1986; Grooten et al, 1993), así mismo está involucrado en la inducción y expresión de genes, en procesos inflamatorios, reparación de tejidos, respuesta inmune y hematopoyesis, se le ha detectado como agente importante en cuadros de artritis e infecciones víricas y bacterianas (Tabla 5)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 5.
Efectos biológicos del TNF- α .

Inflamación.	Importante papel proinflamatorio in vivo debido a la activación de neutrófilos, células mast, endoteliales, macrófagos y fibroblastos.
Pérdida de peso (cachexia).	Esta implicado en pérdida de peso corporal durante cachexia. Su administración produce anemia al abatir la producción y vida media de eritrocitos.
Antitumoral.	Suprime in vivo el crecimiento de células tumorales. Esta implicado en la regresión de tumores en modelos animales. En algunos casos de leucemia mieloide aguda, actúa en sinergismo con GM-CSF para inducir proliferación.
Antibacterial	Actúa contra infecciones bacterianas mediante la activación de neutrófilos, monocitos y eosinófilos. Promueve el crecimiento de células T, induce receptores para IL-2 y síntesis de IFN- γ .
Resorción de hueso.	Estimula la resorción de hueso por acción directa en osteoblastos y células osteocásticas. Suprime la síntesis de colágeno y fosfatasa alcalina en osteoblastos.
Autoinmunidad	Esta involucrado en la patogénesis de Lupus, nefritis.
Efectos en hematopoyesis	Suprime la proliferación de células precursoras hematopoyéticas humanas. Actúa como radio y quimio protector. Potencia el crecimiento de células progenitoras humanas y de ratón, estimuladas con IL-3 o GM-CSF.

(Tomado y modificado de Bharat & Jordan 1992).

Debido a su importancia como inmunomodulador y agente antitumoral tanto in vitro como in vivo, se le ha examinado extensivamente como una alternativa terapéutica en tratamientos de cáncer, así en estudios preclínicos se ha administrado en combinación con otras citocinas y agentes quimioterapéuticos (Beyert & Fiers 1998), sin embargo sólo en muy pocos casos se han logrado actividades sinérgicas favorables y remisiones parciales (Negrier et al, 1992)

El papel del TNF- α en hematopoyesis se ha estudiado ampliamente y se reportan efectos tanto estimuladores como inhibidores, dependiendo del sistema y de la naturaleza de las células hematopoyéticas (Lcetscher et al, 1991; Caux et al, 1990; Murphy et al, 1988; Wisniewski et al, 1987). Aunque inicialmente se le identificó como un factor citotóxico posteriormente demostró propiedades estimuladoras del crecimiento en diversos tipos celulares (Vilcek et al, 1986; Digel et al, 1989), en este contexto se ha demostrado que puede actuar de manera sinérgica con IL-3 o GM-CSF, para potenciar el crecimiento de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ de ratón (Blackx et al, 1991; Caux et al, 1990). Adicionalmente el TNF- α incrementa la sobrevivencia de cultivos individuales de células Lin- Sca-1+ en cultivos tratados con IL-1 β , este incremento en la sobrevivencia de células progenitoras responsivas a IL-1 β se correlaciona con un incremento en el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

número de células viables y supresión de apoptosis. El sinergismo entre $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$ que media la supresión de apoptosis en células progenitoras Lin- Sca-1+ in vitro, es particularmente interesante considerado el papel radioprotector (Neta et al, 1988) que de manera sinérgica tienen ambas citocinas, y que explica al menos en parte el mecanismo radioprotector.

A pesar de los estímulos positivos, el $TNF-\alpha$ es un clásico supresor de la hematopoyesis in vitro (Murphy et al, 1988), que inhibe la proliferación de células progenitoras de médula ósea de ratón y humano, en respuesta a la mayoría de las citocinas que se emplean como estimuladoras, incluidas el SCF (Degliantoni et al, 1985; Caux et al, 1991).

EL INTERFERÓN GAMMA.

El $IFN-\gamma$ se identificó hace 30 años debido a su actividad antiviral. Las principales células productoras son: las células NK activadas (Perussia, 1991), los linfocitos T auxiliares y los linfocitos T citotóxicos $CD8+$ (Sad et al, 1995). En los linfocitos T el principal inductor de $IFN-\gamma$ es el entrecruzamiento del TCR (Ullman et al, 1990), sujeto a otras condiciones reguladoras impuestas por el estado de diferenciación de la célula efectora. En las células NK, la producción de $IFN-\gamma$ es estimulada por citocinas derivadas de macrófagos, especialmente el $TNF-\alpha$ y la $IL-12$ (Trinchieri et al, 1995).

El $IFN-\gamma$, IFN inmune o IFN de tipo II, es una glicoproteína homodimérica de 21-24 kDa constituida por 143 residuos de aminoácidos, la cual presenta diferentes grados de glicosilación. Cada subunidad contiene 6 α -hélices con la ausencia de hojas β -plegadas. El $IFN-\gamma$ está codificado en un gen único ubicado en el cromosoma 12 humano en la región p12.05 (Bharat & Jordan, 1992).

Mientras el $IFN-\alpha$ y el $IFN-\beta$ son producidos típicamente por leucocitos y fibroblastos, el $IFN-\gamma$ es producido en los linfocitos T y en las células NK después de estímulos inmunológicos. Sin embargo el $IFN-\alpha$ y β no son inducidos directamente en las células después de una infección viral (Pestka, 1997).

El $IFN-\gamma$ posee un amplio espectro de actividad y está involucrado en interacciones complejas (Tabla 6). Desempeña actividad antiviral, impacto en el metabolismo celular y en la diferenciación,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

conduciéndola hacia monocitos; e inhibe la proliferación de células tumorales, de músculo liso, endoteliales, hematopoyéticas, y la síntesis de colágeno y miofibroblastos (Jonasch & Haluska, 2001). También participa en la regulación de la expresión de moléculas del MHC clase II y la inducción de la síntesis de óxido nítrico, en la regulación de las interacciones leucocito-endotelio, la inducción de componentes de la cascada del complemento, y la respuesta de fase aguda. El IFN- γ también está involucrado en mecanismos de apoptosis, donde el mecanismo aún no está esclarecido (Boehm, 1997).

Tabla 6.
Efectos biológicos del IFN- γ

Efectos en presentación de antígenos	Aumenta la expresión de moléculas del MHC clase I y II.
Efectos en inmunidad	Aumenta receptores para IgG tipo I y III en monocitos, macrófagos y polimorfonucleares
Efectos en Hematopoyesis	Estimula a las células NK, linfocitos T, incrementa la producción de anticuerpos por linfocitos B y es activador de macrófagos.

(Tomada y modificada de Flores, 2000).

Así, el conocimiento de las citocinas que son capaces de modular la expresión de los Fc γ Rs en células primitivas es de gran interés, ya que, la mayoría de los cuadros patológicos mencionados previamente, relacionados con la expresión aumentada o disminuida de los Fc γ Rs, se observan en células maduras, por lo cual si se condiciona a células primitivas para restablecer niveles adecuados de los Fc γ Rs, mediante la adición de citocinas se estará generando una gran cantidad de células maduras con niveles normales de estos receptores, que puedan desarrollar finalmente y de manera exitosa la respuesta inmune del organismo; de esta forma se puede establecer a algunas citocinas como una opción terapéutica para corregir cuadros patológicos adversos.

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Es conocido que los Fc γ Rs son moléculas fundamentales en la eliminación de complejos antígeno-anticuerpo ya que sirven de puente entre la respuesta inmune humoral y la celular. Se sabe que el estímulo de diversas citocinas como el IFN- γ y el TNF- α induce la expresión de Fc γ Rs en células maduras (Lian & Simon, 1994), no obstante la modulación de estos receptores en células hematopoyéticas primitivas es poco conocido, y de gran importancia, ya que pueden originar células maduras mieloides con niveles normales de Fc γ Rs, que ayuden a eliminar los cuadros patológicos adversos. Recientemente mostramos que la rhIL-1 β también inhibe la proliferación de las células 32D mediante un mecanismo que consiste en la inducción de ARNm y proteína bioactiva de TNF- α (Ledesma, 2002); además hemos mostrado que la IL-1 β e IFN- γ modulan notablemente la expresión en membrana de los Fc γ Rs en células hematopoyéticas multipotenciales 32D de ratón (Martínez, 2000), sin que sea claro que tipo de receptor es inducido. Por ello, el presente trabajo tiene como finalidad establecer si el IFN- γ , TNF- α e IL-1 β modulan la expresión de ARNm para cada uno de los tres Fc γ Rs en células multipotenciales y establecer si existen o no semejanzas en el patrón de expresión de los receptores, particularmente entre el TNF- α e IL-1 β ya que comparten rutas de activación celular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JUSTIFICACIÓN.

Los Fc γ Rs, en condiciones normales, son moléculas importantes debido a su participación en la respuesta inmune, induciendo varios procesos biológicos que tienen la finalidad de destruir al agente patógeno, ya sea por fagocitosis e inflamación o por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, que es la principal vía de eliminación de células tumorales y bacterias. Sin embargo, también se sabe que los Fc γ Rs desempeñan un papel principal en el progreso de cuadros patológicos adversos como las enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, Nefritis, diabetes, etc.), donde altos niveles de Fc γ Rs pro-inflamatorios (Fc γ RI y Fc γ RIII) son responsables de la inflamación (Zusman et al, 1996). Esto es relevante ya que se sabe que a nivel nacional este tipo de enfermedades ocupa el 47 % en los gastos médicos y de hospitalización de estos pacientes, además de que originan un 28 % de la mortalidad reportada en el país por el Sistema Nacional de Salud (Dir. Gral de Est. e Inf, Secretaría de Salud, 2000). Es por estas razones que se hace necesario conocer los diversos factores que modulen a los receptores Fc γ desde estadios tempranos de diferenciación celular, y así ofrecer una alternativa terapéutica para obtener células maduras eficientes en el control del progreso de la autoinmunidad y abatir la respuesta inflamatoria.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIPÓTESIS.

La adición de rmIFN- γ , rhIL-1 β y rmTNF- α a las células 32D inducen la expresión diferencial de ARNm para los tres tipos de Fc γ Rs de ratón.

OBJETIVO

Analizar si la IL-1 β , TNF- α y el IFN- γ modulan la expresión de ARNm para el Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII en la línea celular hematopoyética multipotencial 32D de ratón.

OBJETIVOS PARTICULARES.

Identificar los Fc γ Rs expresados constitutivamente en la línea celular hematopoyética multipotencial 32D.

Estudiar el efecto de las citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-1 β sobre la expresión de ARNm de los tres receptores Fc γ Rs en la línea celular hematopoyética multipotencial 32D.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

METODOLOGÍA.

LÍNEAS CELULARES.

Para este trabajo se empleó la línea celular hematopoyética multipotencial de ratón 32D dependiente de interleucina 3 (IL-3), la cual fue donada por la Dra T. Hoang (Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, Montreal, Canadá) y la línea L929 de fibrosarcoma de ratón. Las células fueron cultivadas en medio de cultivo Iscove's Modified Dulbecco's (Gibco BRL, USA) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (Gibco BRL, USA) adicionando 0.5 ng/mL de IL-3 recombinante de ratón (rmIL-3) (R&D System, USA), a excepción de la línea celular L929. Las células se mantuvieron a una temperatura de 37° C y 5% de CO₂ y resemebradas cada 48 hrs.

CITOCINAS RECOMBINANTES.

Para esta tesis se utilizó interferón gamma recombinante de ratón (rmIFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa recombinante de ratón (rmTNF- α), interleucina-1 beta recombinante humana (rhIL-1 β), y rmIL-3 obtenidas de R&D Systems, USA. Estas citocinas se reconstituyeron en PBS al 0.1% de albúmina sérica bovina. En todos los casos las citocinas se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -70° hasta su uso.

CURVAS DOSIS-RESPUESTA.

Para evaluar el efecto de la rhIL-1 β , rmTNF- α , rhTGF- β 1 y rmIFN- γ sobre las células 32D, se cultivaron 1X 10⁵ cel/mL en placas de 96 pozos (Nunclon, USA) en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de los recombinantes antes mencionados, después de 48 h de cultivo se procedió a evaluar el número celular por conteo directo utilizando un hemocitómetro (datos no mostrados). Paralelamente se determinó la viabilidad celular (datos no mostrados) por la técnica de exclusión al azul tripano (Sigma, USA), como se ha descrito previamente (Rodel & Link, 1996; Tanaka et al, 1993). Se efectuaron tres ensayos independientes con tres repeticiones por condición.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTÍMULO DE LAS CÉLULAS PARA EVALUACIÓN DE Fc γ R_s POR RT-PCR.

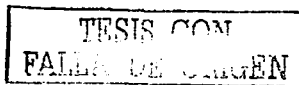
Para evaluar el efecto del rmIFN- γ (25 ng/ml), rmTNF- α (10 ng/ml), rhlL-1 β (5 ng/ml) en la expresión de RNAm de células 32D se realizó un mínimo de tres ensayos independientes. Para cada ensayo se expandieron células 32D en cuatro cajas Fisher de 100X15 mm de superficie de cultivo (Fisherbrand Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania) a 2×10^5 cel/mL durante 48 h. El total de células así obtenidas fueron mezcladas y cultivadas a una densidad inicial de 6×10^5 cel/mL en presencia o ausencia de los recombinantes antes mencionados para periodos de 3, 6 y 12 h, además de un cultivo de cero horas sin estímulo. Una vez transcurrido tales periodos de tiempo se procedió a realizar el lisado de las células.

LISADO CELULAR Y EXTRACCIÓN DE RNA POR TRIZOL.

A partir de este procedimiento todos los materiales son estériles, libres de enzimas que degradan ADN y ARN, y libres de metales. Las células obtenidas del cultivo celular en presencia o ausencia de las citocinas se centrifugaron a 1500 revoluciones por minuto (rpm) (DYNAC, Becton-Dickinson, NJ, USA) por 5 minutos para eliminar el sobrenadante, después se realizó un primer lavado con 10 ml de PBS, seguido de otro lavado con 1 ml de PBS en un tubo eppendorf para obtener el botón celular y finalmente lisarlo

Para lisar las células se adicionó 1ml de reactivo Trizol (Invitrogen; por cada $6-8 \times 10^6$ células) al botón celular de cada muestra por separado, mismo que se resuspendió constantemente hasta lograr una suspensión homogénea y no viscosa. Una vez lisadas todas las muestras, se almacenaron a -70°C hasta la extracción del ARN total.

En el proceso de extracción de ARN, primero se incubó cada muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se adicionaron 0.2 ml de cloroformo, y manualmente se agitó vigorosamente durante 15 segundos para después incubar 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C en una centrifuga refrigerada (Eppendorf, USA). De las tres fases resultantes se separó la fase acuosa con ARN, que es la fase superior, transfiriéndola a otro tubo eppendorf. El ARN presente



se precipitó agregando 0.5 ml de Isopropanol, se agitó manualmente y después en un agitador mecánico (vortex) y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos; posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos de 4°C obteniendo así un botón de ARN. Este botón se lavó eliminando el sobrenadante y adicionando 1 ml de Etanol al 75% en agua desionizada tratada con dietilpirocarbonato al 0.1% (Agua DEPC), se agitó en un vortex y se centrifugó a 7500 rpm por 5 minutos de 2 a 8°C. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. El botón de ARN puro obtenido se resuspendió en agua DEPC (0.1%) en baño maría a 65°C por 5 minutos, después de lo cual se almacenaron a -70°C hasta su uso.

La integridad del ARN se identificó cualitativamente a través de electoroforesis en un gel de agarosa al 2% con 4 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) por cada 100 ml de agarosa en amortiguador TBE 1X (Tris, ácido bórico y EDTA 0.5 M disuelto en agua desionizada estéril). El ARN se agregó al gel mezclado con buffer de carga (Glicerol al 20%, azul de bromofenol al 0.01-0.05 % y xilencianol 0.5 % en agua DEPC) en proporción 1:1. El corrimiento electroforético se realizó a 70 volts, y se visualizó y fotografió en un transiluminador de luz ultravioleta (FotoDyne, Hartland, WI, USA) distinguiéndose las bandas constitutivas de ARN total (18S y 28S). La cuantificación del ARN se realizó en un espectrofotómetro (Systems 9600 Perkin Elmer, New Jersey, USA) a una longitud de onda de 260 y 280 nm.

RETROTRANSCRIPCIÓN (RT).

El ARN de cada muestra fue retrotranscrito a ADN complementario (ADNc) por la técnica universal de RT utilizando el kit Gene Amp RNA PCR (Perkin Elmer, USA). A cada muestra se le agregó 1 µg de ARN y además 2.0 µl de MgCl₂ (25mM), 1.0 µl de buffer de PCR 10X, 4µl de mezcla de DNTP's (DATP, DCTP, DGTP, DTTP 10 mM) , 0.5µl de Transcriptasa Reversa (MuLV) (50 U/µl) , 0.5 ml de inhibidor de RNAsas (20 U/µL), 0.5 µl del primer Oligo dT (5µM) con el cual se retrotranscribe únicamente al ARNm a partir del ARN total, y 0.5 µl de ditiotreitilo (DTT) (0.1M). El volumen total de la reacción de 10 µl se incubó 60 minutos a 42° C, posteriormente 10 minutos a 90° C y por último un periodo de 10 minutos a 4° C utilizando para ello un termociclador (Systems 9600 Perkin Elmer, New Jersey, USA) al final de cual se obtuvo ADNc.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

El ADNc producto de la Reacción Inversa fue amplificado a través de la reacción en cadena de la polimerasa utilizando una mezcla de reacción que consiste de 2 μ l de $MgCl_2$ (25mM), 4 μ l de buffer de PCR 10X, 28.35 μ l de agua DEPC, 1 μ l de dNTP's, 0.25 μ l de DNA polimerasa (Amplitaq 5 U/mL), 10 μ l de ADNc, 0.2 μ l del oligonucleótido específico (primer) para β -actina y 2 μ l del primer correspondiente (1 μ M).

PRIMER	SECUENCIA	TAMAÑO	REFERENCIA
β -actina	sentido: GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG antisentido: GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG	238 pb	(Johnsen et al, 1998)
Fc γ RI	Sentido: CTG CAG GAG TGT CCA TCA CGG TGA AAG A Antisentido: GGA TGT GAA ACC AGA CAG GAG CTG ATG A	350 pb	(Sandor et al, 1994a; Sandor et al, 1994b).
Fc γ RII	Sentido: GCT GGA GGA ACA AAC TAC TGA ACA G y Antisentido: GCA GCT TCT TCC AGA TCA GGA GGA	Fc γ RIIb1: 477 pb y Fc γ RIIb2: 339 pb	
Fc γ RIII	Sentido: AGT CAC AGT GGG GAC TAC TAC TGC A Antisentido: CAC TTG TCT TGA GGA GCC TGG TGC T	256 pb	

Se obtuvo un volumen final de reacción de 50 μ l, el cual se incubó un minuto con 45 segundos a 95° C, ligado a 35 ciclos de dos segmentos uno de 15 segundos a 95° C y otro de 30 segundos a 60° C respectivamente, seguido de 7 minutos a 72° C, para ligarse finalmente a un ciclo de 15 minutos a 4° C en el termociclador (Systems 9600 Perkin Elmer, New Jersey, USA).

ELECTROFORESIS DEL PRODUCTO DE RT-PCR.

Para observar el producto de RT-PCR, éste se separó en un gel de agarosa preparado como se menciona previamente para el ARN. Los 50 μ l totales de cada muestra de PCR se agitaron en un vortex y posteriormente se tomaron 4 μ l a los que se les incorporó 4 μ l de amortiguador de carga; una vez homogenizado; se coloca cada muestra en un pozo del gel sumergido en amortiguador TBE 1X. Se corrió el gel como se ha mencionado anteriormente durante 45 minutos, después de los cuales se visualizó con luz UV y los resultados se fotografiaron con cámara CCD Foto/Analyst

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(FotoDyne, Hartland, WI, USA), identificándose las bandas de ARNm para cada uno de los tres Fc γ R's mencionados. Se empleó un marcador molecular de ADN (0.05 μ g/ μ l) de rango bajo con pesos moleculares que van de 147, 160, 180, 190, 201, 217, 242, 307, 404, 527, a 622 pb (Biotecnologías Universitarias, México), como patrón de referencia para los productos obtenidos.

ANÁLISIS DE IMAGEN.

Para este análisis se eligió una imagen representativa de las tres repeticiones de cada condición. La intensidad de cada banda de las imágenes obtenidas se analizó en el programa Collage versión 3.0 (Hartland, WI, USA) obteniendo así un valor numérico. La intensidad de cada banda reportada por el software fue estandarizada y se compararon los valores de intensidad entre Fc γ R y β -actina (con o sin estímulo) obteniéndose un cociente. Para observar la diferencia en el nivel de expresión de ARNm entre el Fc γ R con estímulo y el basal se restó el cociente de la intensidad del Fc γ R con estímulo al valor del cociente sin estímulo (en unidades relativas, pues se basan en β -actina), lo cual nos permite observar finalmente la modulación de los Fc γ Rs para cada uno de los tiempos del estudio. El resultado final de la modulación observada para el Fc γ RII fue graficado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS.

Las células 32D expresan niveles basales de ARNm para los tres tipos de Fc γ R_s.

Con la finalidad de estudiar la modulación a la expresión de los genes de los Fc γ R_s en las células 32D, primero se evaluó la expresión basal de los receptores Fc γ R_I, Fc γ R_{II} y Fc γ R_{III} en este tipo de células, empleando a la línea de células fibroblásticas de ratón L929 como control negativo de la expresión de estos receptores. Los resultados muestran la presencia basal de ARNm de los tres Fc γ R_s específicamente en las células 32D ya que las células L929 no lo expresan (Figuras 4, 5 y 6; sólo carriles BAS y L929).

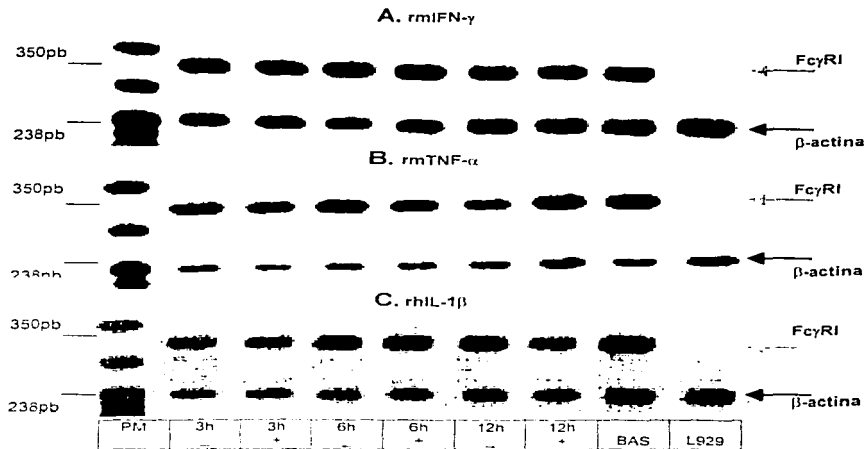


Figura 4. Producto de RT-PCR para Fc γ R_I en células 32D a 3, 6 y 12 h en presencia (+) o ausencia (-) de A: 25 ng/ml de rmIFN- γ , B: 10 ng/ml de rmTNF- α y C: 5 ng/ml de rhIL-1 β . BAS, expresión basal de ARNm para Fc γ R_s en las células 32D; L929, línea de células fibroblásticas utilizadas como control negativo para la presencia de Fc γ R_s; PM, marcador de pesos moleculares.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El IFN- γ , TNF- α e IL-1 β no modulan la expresión de ARNm para el Fc γ RI y Fc γ RIII.

Una vez establecido que existe expresión basal de los Fc γ R en las células 32D, se procedió a evaluar el efecto de las citocinas rmlFN- γ , rmTNF- α y rhIL-1 β sobre la inducción a la expresión de ARNm del Fc γ RI y Fc γ RIII en células 32D de ratón. Los resultados muestran que después de estimular independientemente a las células 32D con 25 ng/ml de rmlFN- γ , 10 ng/ml de rmTNF- α y 5 ng/ml de rhIL-1 β durante 3, 6 y 12 h, el análisis de imagen no muestran cambios en la expresión de ARNm de los receptores Fc γ RI (359pb) (Figura 4A, 4B y 4C) y Fc γ RIII (256pb) (Figura 5A, 5B y 5C), ya que en ambos casos es similar al nivel de expresión basal. Las ligeras variaciones observadas en las figuras de los receptores Fc γ RI y Fc γ RIII no son relevantes a pesar de la modulación aparente de algunos carriles.

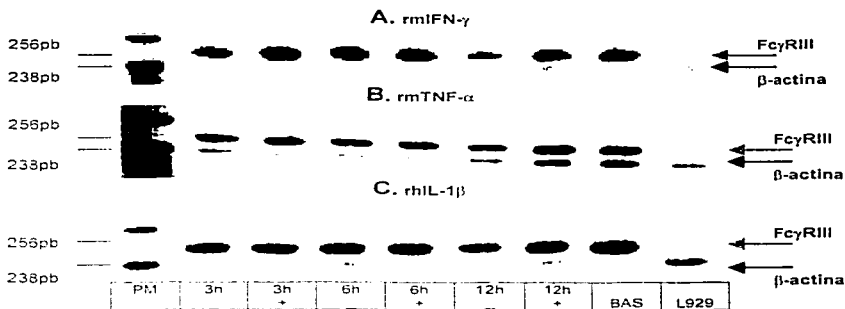


Figura 5. Producto de RT-PCR para Fc γ RIII en células 32D a 3, 6 y 12 h en presencia (+) o ausencia (-) de A. 25 ng/ml de rmlFN- γ ; B. 10 ng/ml de rmTNF- α y C. 5 ng/ml de rhIL-1 β . BAS, expresión basal de ARNm para Fc γ Rs en las células 32D. L929, línea de células fibroblásticas utilizadas como control negativo para la presencia de Fc γ Rs. PM, marcador de pesos moleculares.

El IFN- γ , TNF- α e IL-1 β modulan la expresión de RNAm para el Fc γ RII.

Para observar el efecto modulador de las citocinas en la expresión de ARNm del Fc γ RII en células 32D de ratón, estas células fueron cultivadas con 25 ng/ml de rmIFN- γ , 10 ng/ml de TNF- α y 5 ng/ml de rIL-1 β durante 3, 6 y 12 h. El primer seleccionado para la amplificación del Fc γ RII permite observar la expresión de dos isoformas biológicas del Fc γ RII: Fc γ RIIb1 (477pb) y Fc γ RIIb2 (339pb). Los resultados muestran que las tres citocinas inducen una modulación positiva sobre la expresión de ARNm del Fc γ RIIb2 desde las 3 h de estímulo (A, B y C), mientras que la única citocina capaz de modular al Fc γ RIIb1 es el TNF- α (Fig 6B), ya que disminuyen los niveles basales del receptor (Fig 6).

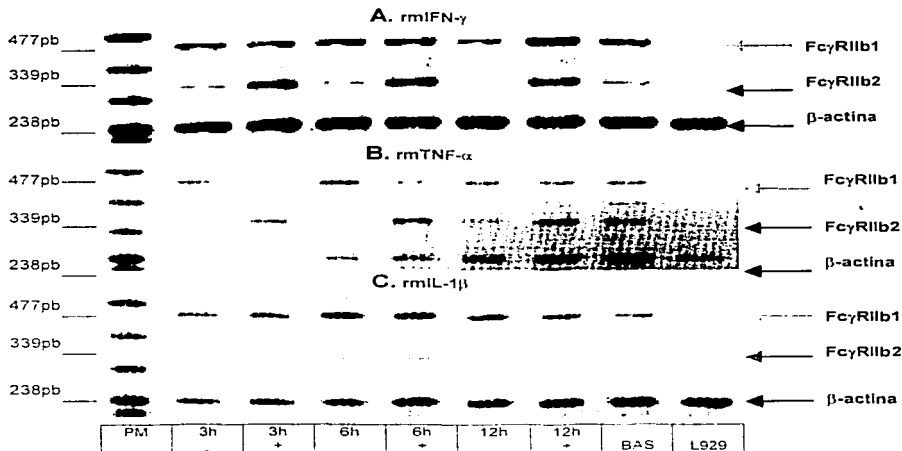


Figura 6. Producto de RT-PCR para Fc γ RIIb1 y Fc γ RIIb2 en células 32D a 3, 6 y 12 h en presencia (+) o ausencia (-) de A. 25 ng/ml de rmIFN- γ , B. 10 ng/ml de rmTNF- α y C. 5 ng/ml de rIL-1 β . BAS, expresión basal de ARNm para Fc γ Rs en las células 32D. L929, línea de células fibroblásticas utilizadas como control negativo para la presencia de Fc γ Rs. PM, marcador de pesos moleculares

Para analizar en forma mas precisa el efectos de las tres citocinas sobre la expresión de ARNm de ambas isoformas del Fc γ RII se realizó un análisis de imagen del ADNc obtenido a partir de células cultivadas durante 6 h, el tiempo de mayor estímulo de ARNm. Los resultados de la comparación muestran que el rmIFN- γ induce la expresión de ARNm para ambas isoformas de Fc γ RII, aunque la isoforma Fc γ RIIb2 es estimulada en una mayor proporción que la isoforma Fc γ RIIb1; mientras que el rmTNF- α estimula la expresión de la isoforma Fc γ RIIb2 a la vez que inhibe a la isoforma Fc γ RIIb1; finalmente la rhIL-1 β modula positivamente la expresión de ambas isoformas sin mostrar diferencias entre ellas, aunque su estímulo no alcanza los niveles inducidos por el rmTNF- α (Figura 7). Sólo se muestra el gráfico de la modulación para el Fc γ RII, ya que fue el único receptor para el que el análisis de imagen reveló homogeneidad.

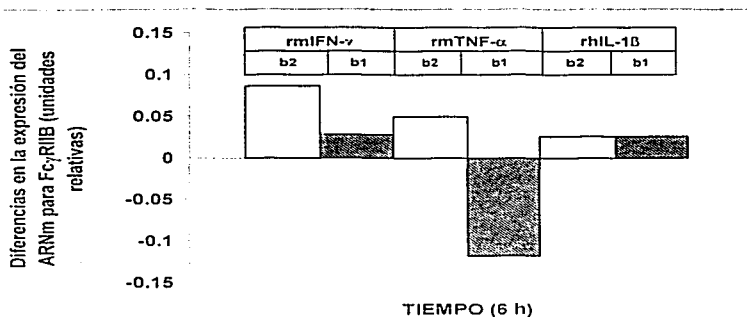


Figura 7. Diferencias en la expresión de ARNm para Fc γ RII en células 32D. Después de estimular a las células 6 h con rmIFN- γ , rmTNF- α y rhIL-1 β se comparo la intensidad de la expresión de ARNm para el Fc γ RII contra células sin estímulo; las barras vacías corresponden a la isoforma b2 y las barras con diagonales a la isoforma b1; la diferencia es la intensidad banda del Fc γ R con estímulo menos la intensidad del Fc γ R sin estímulo, después de homogeneizar la intensidad de banda de la β -actina en cada experimento.

DISCUSIÓN .

En esta tesis se muestra por primera vez la expresión basal de los tres Fc γ R: Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII a nivel de ARNm en la línea celular hematopoyética multipotencial 32D de ratón dependiente de IL-3, (Figs 4-6), a diferencia de las células primitivas FDCP2/185-4 también dependientes de IL-3, donde sólo encuentran la expresión del ARNm para el Fc γ RIII (Yoshikawa, 1996). Así, ambos datos sugieren que las células primitivas hematopoyéticas de ratón expresan niveles basales de ARNm para los Fc γ R.

Aunque mostramos la expresión basal del ARNm para los tres tipos de Fc γ R en las células 32D, no se conoce si todos son traducidos a proteína, ya que se ha mostrado que en condiciones normales el ARNm puede ser degradado en el retículo endoplásmico, como ocurre con el Fc γ RIII en células progenitoras de mastocitos (Lobell et al, 1993). Es por ello que sería interesante en un futuro evaluar si los tres receptores también están presentes en la membrana de las células multipotenciales 32D, lo cual es factible, ya que se ha mostrado que un 6 % de las células 32D forma rosetas, un indicador de la presencia de Fc γ R a nivel de membrana (Martínez 2000); incluso se ha revelado la presencia de niveles reducidos pero detectables de proteína Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII en células primitivas hematopoyéticas humanas CD34+ (Kolb-Maurer et al, 2002).

No se puede negar la participación de los receptores Fc gamma en la fagocitosis, presentación de antígenos, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, inflamación, alergia e inhibición de la proliferación en células mieloides maduras (Ravetch & Bolland, 2001), aunque no es claro el papel que desempeñan los Fc γ R en las células primitivas hematopoyéticas, ya que no participan en la macropinocitosis y fagocitosis en las células primitivas hematopoyéticas humanas CD34+ (Kolb-Maurer et al. 2002) Sin embargo, la interacción de IgG con los Fc γ RIII de las células FDCP2/185-4 dependientes de IL-3 les permite sobrevivir en ausencia de este factor (Yoshikawa et al, 1996). Así, aunque los niveles de expresión de los Fc γ R son apenas detectables en las células hematopoyéticas primitivas, parece que pueden ser suficientes para promover la sobrevivencia de este grupo de células.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

También mostramos que la expresión del Fc γ RI y el Fc γ RIII no es modulada por la adición de IFN- γ , TNF- α e IL-1 β . No existen publicaciones previas sobre la modulación de ARNm para los receptores Fc para la IgG en células primitivas hematopoyéticas, por que se dificulta la comparación, pero existen datos que indican que en células mieloides maduras, como los macrófagos de ratón y una línea monocítica humana, el IFN- γ es potenciador de la expresión de ARNm y proteína del Fc γ RI (Gessl et al, 1994; Sivo et al, 1993), de igual manera, es inducido el Fc γ RIII en células cebadas y líneas macrofágicas (Sivo et al, 1996; Weinshank et al, 1988, Okayama et al, 2001). Por otro lado, la IL-1 β induce la formación de rosetas en las células 32D (Santiago, 1996, Martínez, 2000), lo cual sugiere que existe una modulación de ARNm para estos receptores. Por lo anterior, se hace necesario confirmar nuestros datos con técnicas mas sensibles, como la RT-PCR en tiempo real, la cual permite ver diferencias de incremento de ARNm a pesar de partir con RNA basal.

Nuestros resultados también muestran que la expresión del Fc γ RII es modulada en forma diferencial a nivel de ARNm por IFN- γ y TNF- α e IL-1 β en células 32D de ratón estimuladas hasta por 12 h (Figs 6A, 6B y 6C). En el caso particular del IFN- γ , mostramos una modulación positiva para ambas isoformas del Fc γ RII, pero se induce con mayor intensidad la isoforma Fc γ RIIb2. Este hecho es interesante, ya que se sabe que el IFN- γ induce la diferenciación de las células 32D hacia macrófagos (Martínez, 2000, Ledesma, 2002), y la isoforma b2 es un receptor característico de macrófagos (Bonnerot & Daeron, 1994, Zusman et al, 1996, Fridman et al, 1992), por lo tanto, se sugiere que el IFN- γ participa en la inducción de la diferenciación morfológica hacia macrófagos (Martínez, 2000), acompañada de la inducción a la expresión del Fc γ RIIb2. No se puede afirmar un mecanismo similar para el TNF- α e IL-1 β , ya que las células 32D no muestran signos de diferenciación al estimularlas con, por periodos aún más prolongados con estos factores (Ledesma, 2002).

En el caso del TNF- α , este factor indujo la expresión de ARNm para Fc γ RIIb2 pero abatió la expresión de la isoforma Fc γ RIIb1 en células 32D. Considerando que la isoforma Fc γ RIIb2 es típico del linaje mieloides, como lo es el macrófago (Fridman et al, 1992), mientras que el Fc γ RIIb1

es un receptor típico de linaje linfóide (linfocitos B) (Bonnerot & Daéron, 1994; Zusman et al, 1996), nuestros datos sugieren que el TNF- α inclina el comprometimiento hacia el linaje mielóide, pero es probable que se requiera una señal adicional para completar el proceso de diferenciación, ya que este factor es incapaz de diferenciar las células 32D hacia el linaje macrófágico (Ledesma 2002). Por otro lado, en cuanto al efecto de IL-1 β sobre el Fc γ RII, se mostró un incremento equitativo de ambas isoformas del Fc γ RII; Fc γ RIIb1 y Fc γ RIIb2 (Fig 6C) que se correlaciona con el incremento en la formación de rosetas reportado en células primitivas mieloides por efecto de la IL-1 β (Martínez, 2000), por lo cual se sugiere que el Fc γ RII es el receptor responsable de tal incremento en la expresión en membrana de los Fc γ Rs, ya que fue el único que mostró una modulación positiva evidente.

La modulación de la expresión del Fc γ RII a nivel de ARNm por IFN- γ , TNF- α o IL-1 β en células primitivas hematopoyéticas no ha sido estudiada; sin embargo, se conoce que estos factores modulan la expresión de este gen en células maduras como eosinófilos de ratón (de Andres et al, 1994), células B (Rudge et al, 2002), monocitos-macrófagos (Gessl et al, 1994; Liao & Simon, 1994), y células monocíticas U937 humanos (Weinshank et al, 1988). Por lo tanto, será necesario realizar más estudios en otras células similares a 32D para ver si esta capacidad la tienen otras células hematopoyéticas primitivas o es una particularidad de esta línea celular.

En cuanto a la comparación de los patrones de inducción del ARNm del Fc γ RII con las diferentes citocinas, nuestros resultados son particularmente interesantes, pues muestran que la IL-1 β , el IFN- γ y el TNF- α tienen un patrón diferencial en la inducción del Fc γ RII, ya que el IFN- γ estimula fuertemente la expresión de ambas isoformas, mientras que el estímulo de TNF- α induce la isoforma Fc γ RIIb2 pero inhibe a la isoforma Fc γ RIIb1, a diferencia de la IL-1 β que sólo induce parcialmente ambas isoformas, (Figs 6A, 6B, 6C y Fig 7). Estos datos sugieren que cada citocina empleada tiene una ruta de activación independiente para la expresión de ARNm.

Llama la atención que la IL-1 β y el TNF- α muestran capacidad diferente para estimular la expresión de Fc γ Rs, ya que se conoce que ambas citocinas comparten un efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células 32D, incluso la IL-1 β inhibe la proliferación de las células primitivas 32D

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

a través de la producción de TNF- α (Martínez, 2000; Ledesma 2002), en base a esto nuestros resultados sugieren que dicho efecto compartido entre la IL-1 β y el TNF- α no es aplicable para la inducción de Fc γ Rs.

Por último, se sabe que tanto el Fc γ RI como el Fc γ RIII propician una reacción inflamatoria, mientras que el Fc γ RIIB tiene el efecto contrario suprimiendo la inflamación (Radeke et al, 2002; Clynes et al. 1999; Trindandapani et al, 2002). Al respecto se ha publicado que los cuadros patológicos como las enfermedades autoinmunes, aparecen como consecuencia de la pérdida de este balance entre el Fc γ R inflamatorio y el inhibitorio, ya que se ha mostrado que en estos cuadros patológicos existe una deficiencia en los niveles del Fc γ RIIB, lo cual conduce a una inflamación crónica (Radeke et al, 2002; Ravetch et al, 2001). Actualmente existen pocos estudios sobre modulación de Fc γ Rs en células primitivas (Santiago, 1996; Martínez, 2000), razón por la que es relevante que en esta tesis se muestre que el TNF- α y el IFN- γ actúen como inductores del receptor anti-inflamatorio Fc γ RIIB, por lo que sería interesante también evaluar en un futuro esta expresión en proteína para comprobar si estos factores pueden ser citocinas útiles para controlar o eliminar los cuadros patológicos de tipo inflamatorio crónico. El hecho que se puedan modular desde las células primitivas hematopoyéticas tiene gran ventaja considerando que estas células pueden dar origen a diferentes células del sistema inmune, lo cual puede potenciar el efecto terapéutico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES.

Las células multipotenciales hematopoyéticas 32D de ratón expresan ARNm para los tres FcγRs en condiciones basales.

El IFN-γ, TNF-α e IL-1β no modulan la expresión de ARNm para el FcγRI y FcγRIII.

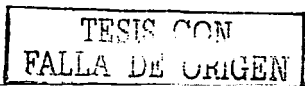
Las citocinas IFN-γ y TNF-α modulan positivamente la expresión de ARNm de FcγRIIb2.

El TNF-α además de estimular FcγRIIb2 al mismo tiempo bloquea la expresión de ARNm de FcγRIIb1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFÍA.

- Aiyer R, Aggarwal B. 1998. Tumor necrosis factors. (Ed.) Pdock ER. CRC Handbook on cytolytic lymphocytes and complement: effectors of the immune system. Boca Raton Press, Florida, 132pp
- Althem K, Bartfai T. 1998. The interleukin-1 system: receptors, ligands and ICE in the brain and their involvement in the fever response. *Ann New York Acad Sci.* 840(1):51-58.
- Backman K, Guyre P. 1994. Gamma-interferon inhibits Fc receptor II-mediated phagocytosis of tumor cells by human macrophages. *Cancer Res.* 54(9) 2456-2461.
- Bharat B, Jordan U. 1992. Human cytokines. Blackwell Scientific Publications, London 405 pp.
- Biliiau A, Van Damme J, Opdenmarker C, Fibbe W, Faikenburg J. 1986. Interleukin-1 as a cytokine inducer. *Immunol* 172(3-5) 323-335.
- Blackx B, Broeders L, Bot F, Lowenberg B. 1991. Positive and negative effects of tumor necrosis factor on colony growth from highly purified bone marrow progenitors. *Leukemia.* 5(1):66-70.
- Boehm U, Klamp I, Groot M, Howard JC. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:749-795.
- Bonnerot C, Daeron M. 1994. Biological activities of murine low-affinity Fc receptors for IgG. *Immunomethods.* 4(1):41-47.
- Boosalis M, Ikuta T, Pace B, da Fonseca S, White G, Faller D, Perrine S. 1997. Abrogation of IL-3 requirements and stimulation of hematopoietic cell. *Blood Cells Mol Dis.* 23(3):434-442.
- Carter A, Silvian-Draxler I, Tatarsky I. 1992. Effect of interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-alpha on the blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Am J Hematol.* 40(4):245-251.
- Cassard L, Cohen-Solal J, Galinha A, Sastre-Garau X, Mathiot C, Galon J, Dorval T, Bernheim A, Fridman W, Sautès-Fridman 2002. Modulation of tumor growth by inhibitory Fcγ receptor expressed by human melanoma cells. *J Clin Inv.* 110(10) 1549-1557.
- Caux C, Favre C, Saeland S, Duvert V, Durand P, Mannoni P, Banchereau J. 1991. Potentiation of early hematopoiesis by tumor necrosis factor-α is followed by inhibition of granulopoietic differentiation and proliferation. *Blood* 78(3) 635-644.
- Caux C, Saeland S, Favre C, Dubert V, Mannoni P, Banchereau J. 1990. Tumor necrosis factor-alpha strongly potentiates interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced proliferation of human CD34+ hematopoietic progenitors cells. *Blood.* 75(12):2292-2298.
- Chong B, Pilgrim R, Cooley M, Chesterman C. 1993. Increased expression of platelet IgG Fc receptors in immune heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 81(4) 988-993.
- Giacci-Woolwine F, Kucera L, Richardson S, Iyer N, Mizel S. 1997. Salmonellae activate tumor necrosis factor alpha production in a human promonocytic cell line via a released polypeptide. *Infect Immun.* 65(11):4624-4633.
- Clark B, Collins K, Gandy M, Webb A, Auron P. 1985. Genomic sequence for human prointerleukin-1 beta: possible evolution from a reverse transcribed prointerleukin 1 alpha gene. *Nucleic Acids Res.* 14(20) 7897-7914.
- Clynes R, Maizes J, Gunamard R, Ono M, Takai T, Ravetch J. 1999. Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *J Exp Med.* 189(1) 179-185.
- Clynes R, Ravetch J. 1995. Cytotoxic antibodies trigger inflammation through Fc receptors. *Immunity.* 3(1) 21-26.
- Clynes R, Towers T, Presta L, Ravetch J. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med.* 6(4) 443-446.
- Cole N, Bao S, Wilcox M, Husband A. 1999. TNF-alpha production in the cornea in response to *Pseudomonas aeruginosa challenge*. *Immunol Cell Biol* 77(2) 164-166.
- Davis J, Narachi M, Aiton K, Araiawa T. 1987. Structure of human tumor necrosis factor-α derived from recombinant DNA. *Biochem* 26(5) 1322-1325.
- de Andrés B, Cardaba B, del Pozo V, Martín-Orozco E, Gallardo S, Tramon P, Palomino P, Lahoz C. 1994. Modulation of the Fc gamma RII and Fc gamma RIII induced by GM-CSF, IFN-gamma and IL-4 on murine eosinophils. *Immunology* 83(1) 155-160.
- Debets R, Timans J, Honeij B, Zuravski S, Sana T, Lo S, Wagner J, Edwards G, Clifford T, Menon S, Bazan F, Kastelein R. 2001. Two novel IL-1 family members, IL-16 and IL-1c, function as an antagonist and agonist of NF-κB activation through the orphan IL-1 receptor-related protein 2. *J Immunol.* 167(3):1440-1446.
- Deghloni G, Murphy M, Kobayashi M, Francis B, Perussia G, Trinchieri G. 1985. Natural killer (NK) cell-derived hematopoietic colony inhibiting activity and NK cytotoxic factor: relationship with tumor necrosis factor and synergy with immune interferon. *J Exp Med.* 162(5) 1512-1530.



- Deo Y, Graziano R, Repp R, van de Winkel J. 1997. Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc γ R-directed therapy. *Immunity* 18(3):127-135.
- Digel W, Stefanic M, Schoniger W, Buck C, Raghavachar A, Frickhofen N, Heimpel H, Porzolt F. 1989. Tumor necrosis factor induces proliferation of neoplastic B cells from chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 73(5):1242-1246.
- Dijkstra Bloem H, van de Winkel J, Kallenberg C. 2001. Inflammation in autoimmunity: receptors for IgG revisited. *Trends Immunol.* 22(9):510-516.
- Dinarello C. 1991. Interleukin-1 and Interleukin-1antagonism. *Blood* 77(8):1627-1652.
- Dinarello C. 1994. The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw.* 5(8):517-531.
- Dinarello C. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87(6):2095-2147.
- Dirección General de Estadística e Informática, Secretaría de Salud, México. 2000. *Revista Salud Pública de México* 42(5), 456-470.
- Dunne J, Feighery C, Whelan A. 1996. Beta-2-microglobulin neopterin and monocyte Fc gamma receptors in opportunistic infections of HIV-positive patients. *Br J Biomed Sci* 53(4) 263-269.
- Erbe D, Pfefferkorn E, Fanger M. 1991. Functions of the various IgG Fc receptors in mediating killing of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 146(9):3145-3151.
- Fibbe W, Falkenburg J. 1990. Regulation of hematopoiesis by interleukin-1. *Biotherapy.* 2(4):325-335.
- Flores F. 2000. Evaluación del efecto del TGF- β y de TNF- α sobre la proliferación de células tumorales Calo, INBI y HeLa provenientes de cerviz Humano. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM
- Flores-Borja F, Santiago E, Weiss-Steider B. 1998. Receptores Fc γ en salud y enfermedad. *Rev Invest Clin* 50(6) 529-540
- Fransen L, Ruysschaert M, Van der Hieden, Fiers W. 1986. Recombinant tumor necrosis factor: species specificity for a variety of human and murine transformed cell lines. *Cell Immunol.* 100(1) 250-267.
- Fridman W, Bonnerot C, Daeron M, Amigorena S, Teillaud J, Sautes C. 1992. Structural bases of Fc γ receptor functions. *Immunol Rev.* 125(1) 49-75.
- Furutani Y, Notake M, Fukui T, Ohue M, Nomura H, Yamada M, Nakamura S. 1986. Complete nucleotide sequence of the gene for human interleukin 1 alpha. *Nucleic Acids Res* 14(8) 3167-3179.
- Garcia R, Feijoo E, Guerrero M, de Gorgolas M, Muñoz-Fernandez M, Fernandez-Cruz E, Ortiz F. 1996. Immune complexes from HIV-1+ patients contain infectious virus able to infect normal lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 98(4) 827-830
- Gasparetto C, Laver J, Abboud M, Gillio A, Smith C, O'Reilly R, Moore M. 1989. Effect of interleukin-1 on hematopoietic progenitors: evidence of stimulatory and inhibitory activities in a primate model. *Blood* 1(4):293-300
- Gessi A, Wilhelm M, Spittler A, Agis H, Krugluger W, Boltz-Nitulescu G. 1994. Influence of Tumour Necrosis Factor- α on the expression of Fc IgG and IgA receptors, and other markers by cultured human blood monocytes and U937 cells. *Scand J Immunol.* 39(2), 151-156.
- Gessner J, Heiken H, Tamir A, Schmidt R. 1998. The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol.* 76: 231-238
- Grooten J, Goossens V, Vanhaesebroeck B, Fiers W. 1993. Cell membrane permeabilization and cellular collapse, followed by loss of dehydrogenase activity, early events in tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. *Cytokine* 5(5) 545-555.
- Guysa P, Morganelli P, Miller R. 1993. Recombinant immune interferon increases Immunoglobulin G Fc receptors on cultured human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 72(11):393-397.
- Hamblin A. 1993. Cytokines and cytokine receptors. IRL Press Oxford University Press, London 90pp.
- Hazenbos W, Gessner J, Hofhuis F, Kuipers H, Meyer D, Heynen I, Schmidt R, Sandor M, Capel P, Daaron M, van de Winkel J, Verpeck J. 1996. Impaired IgG-dependent anaphylaxis an Arthus reaction in Fc γ RIII (CD16) deficient mice. *Immunology* 5(2) 181-188.
- Hibbs M, Hogarth P, Collins P, McKenzie I. 1985. The cell surface phenotype of mouse neutrophils. *J Immunogenet.* 12(4-5) 247-257.
- Hoang T, Haman A, Goncalves O, Letendre F, Mathieu M, Wong G, Clark S. 1988. Interleukin-1 enhances growth-factor dependent proliferation of the clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia and of normal human proliferative hemopoietic precursors. *J Exp Med* 168(2) 463-474.
- Hommes D, Moenan J, de Haas M, ten Kate F, von dem Borne A, Tytgat G, van Deventer S. 1996. Soluble Fc gamma receptor III (CD16) an eicosanoid concentrations in gut lavage fluid from patients with inflammatory bowel disease: reflection of mucosal inflammation. *Gut* 38(4) 564-567.
- Hullelt M, Hogarth P. 1994. Molecular basis of Fc receptor function. *Adv Immunol* 57(1) 1-127.
- Ikejima T, Ikuwawa S, Chezzi P, Van der Meer J, Dinarello C. 1990. IL-1 induces TNF in human PBMC in vitro and a circulating TNF-like activity in rabbits. *J Infect Dis.* 162(1) 215-223.
- Indik Z, Park J, Hunter S, Schreiber A. 1995. The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood* 86(12) 4389-4399.

TESIS CON
FALLA DE CUBREN

- Johnsen A, France J, Man-Sun S, Harding V. 1998. Down-regulation of the transporter for antigen presentation, proteasome subunits, and class I major histocompatibility complex in tumor cell lines. *Cancer Res.* 58(16):3660-3667.
- Jonasch E, Haluska F. 2001. Interferon in oncological practice: review of Interferon biology, clinical applications, and Toxicities. *The Oncologist.* 6(1):34-55.
- Jones E, Stuart D, Walker H. 1989. Structure of tumour necrosis factor. *Nature* 338(6212):225-228.
- Jovic G, Ivanovic Z, Biljanovic-Pauzovic L, Bugarski D, Stosic-Gruijic S, Mljenkovic P. 1996. The effect of IL-1 receptor antagonist on the proliferation of hematopoietic progenitor cells in regenerating bone marrow. *Leukemia* 10(3):564-569.
- Jue D, Shery B, Luedke C. 1990. Processing of newly synthesized cachectin/tumor necrosis factor in endotoxin-stimulated macrophages. *Biochemistry* 29(36):8371-8377.
- Kant A, Advani S, Zingde S. 1995. Decreased expression of both Fc γ RII and Fc γ RIII mRNA in leukemic granulocytes. *Leukemia Res.* 19(12):997-1000.
- Kennedy S, Birch R. 1999. IL-1 β mediates diethylthiocarbamate-induced granulocyte colony-stimulating factor production and hematopoiesis. *Exp Hematol.* 27(2):210-216.
- Kirstein M, Fiers W, Baglioni C. 1936. Growth inhibition and cytotoxicity of tumor necrosis factor in L929 cells is enhanced by high cell density and inhibition of mRNA synthesis. *J Immunol.* 137(7):2277-2280.
- Kolb-Maurer A, Wilhelm M, Weissinger F, Brocker E, Goebel W. 2002. Interaction of human hematopoietic stem cells with bacterial pathogens. *Blood* 100(10):3703-3709.
- Krieglner M, Perez C, DeFay K. 1988. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53(1):45-53.
- Lafage M, Maroñ N, Dubreuil P, de Waal-Malefijt R, Pebusque M, Carcassonne Y, Mannoni P. 1989. The human interleukin-1 alpha gene is located on the long arm of chromosome 2 at band q 13. *Blood* 73(1):104-107.
- Lange W, Brugger F, Rosenthal L, Kanz A, Lindemann A. 1991. The role of cytokines in oncology. *Int J Cell Cloning.* 9(4):252-273.
- Latour S, Fridman W, Daeron M. 1996. Identification, molecular cloning, biologic properties, and tissue distribution of a novel isoform of murine low-affinity IgG receptor homologous to human Fc γ RIIB1. *J Immunol.* 157(1):189-197.
- Ledesma E. 2002. Estudio de la participación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) en la inhibición de la proliferación de la línea celular mieloides multipotencial 32D de ratón estimulada con interleucina 1 beta (IL-1 β). Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- Lejeune F, Ruegg C, Lienard D. 1999. Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Curr Opin Immunol.* 10(5):573-580.
- Liao G, Simon S. 1994. Temporal down-regulation of Fc gamma RIII expression and Fc gamma receptor-mediated phagocytosis in human monocyte-derived macrophages induced by TNF-alpha and IL-1 beta. *J Leukoc Biol.* 55(6):702-710.
- Lobell R, Arm J, Raizman M, Austen K, Katz H. 1993. Intracellular degradation of Fc gamma RIII in mouse bone marrow culture-derived progenitor mast cells prevents its surface expression and associated function. *J Biol Chem.* 268(2):1207-1212.
- Lofscher H, Stenmetz M, Lesslauer W. 1991. Tumor necrosis factor receptor and inhibitors. *Cancer Cells* 3(6):221-226.
- Lovett D, Kezan B, Hadam H, Resch K, Gomsa D. 1985. Macrophage cytotoxicity interleukin 1 as a mediator of tumor cytotoxicity. *J Immunol.* 135(1):340-347.
- Maja M, Lanowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrzkowski Z, Kowalska A, Gowitz M, Emerson S, Ratajczak M. 2001. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34+ cells: myeloblast, erythroblast, and megakaryoblast and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* 97(11C):3075-3085.
- Martínez I. 2000. Efecto de la interleucina-1 beta (IL-1 β) sobre la expresión de receptores Fc para la IgG: diferenciación morfológica y proliferación en la línea celular mieloides primitiva 32D C13 de ratón. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- Mellman I, Koch T, Hozlay G, Hunziker W, Lewis V, Plutner H, Miettinen H, Vaux D, Moore K, Stuart S. 1938. Structure and function of Fc receptors on macrophages and lymphocytes. *J Cell Sci.* 9(1):45-65.
- Morab J, Zucali J. 1992. The therapeutic potential of interleukin-1 and tumor necrosis factor on hematopoietic stem cells. *Leuk Lymphoma* 8(4-5):267-275.
- Murphy M, Porussia B, Trinchieri G. 1999. Effects of recombinant tumor necrosis factor, lymphotxin, and immune interferon on proliferation and differentiation of enriched hematopoietic precursor cells. *Exp Hematol.* 16(2):131-139.

TESIS CON
FALLA DEL CATEDRÁTICO

- Muta T, Kurosaki T, Misulovin Z, Sanchez M, Nussenzweig M, Ravetch J. 1994. A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIb modulates B-cell receptor signalling. *Nature*. 368(6466):70-73.
- Negrier M, Pourreau C, Palmer P, Ranchere J, Mercatello A, Viens P, Blaise D, Jasnin C, Misset J, Franks C. 1992. Phase I trial of recombinant interleukin-2 followed by tumor necrosis factor in patients with metastatic cancer. *J Immunother*. 11(2):93-102.
- Neta R, Oppenheim J, Douches D. 1988. Interdependence of the radioprotective effects of human recombinant interleukin-1 α , tumor necrosis factor- α , granulocyte colony-stimulating factor, and murine recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol*. 140(1) 108-111.
- Okayama Y, Hagaman D, Metcalfe D. 2001. A comparison of mediators released or generated by IFN-gamma-treated human mast cells following aggregation of Fc gamma RI or Fc epsilon RI. *J Immunol*. 166(7):4705-4712.
- Olweus J, Lund-Johansen F, Terstappen L. 1995. CD64/Fc gamma RI is a granulocyte lineage marker on CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 85(9):2402-2413
- Onozaki K, Matsushima K, Aggarwal B, Oppenheim J. 1995. Human interleukin-1 is a cytotoxic factor for several tumor cell lines. *J Immunol*. 135(5):3962-3968
- Oppenheim J, Kovacs E, Matsushima K, Durum S. 1986. There is more than one interleukin 1. *Immunol Today* 7(1) 45-54
- Osman M, Kozak C, McKenzie I, Hogarth P. 1992. Structure and mapping of the gene encoding mouse high affinity Fc gamma RI and chromosomal location of the human Fc gamma RI gene. *J Immunol*. 148(5) 1570-1575
- Pan L, Kreisle R, Shi Y. 1998. Detection of Fc γ receptors on human endothelial cells stimulated with cytokines tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) and interferon gamma (IFN- γ). *Clin Exp Immunol*. 112(3) 533-538
- Pennica D, Nedwin G, Hayflick J, Seedburg P, Derynck R, Palladino M, Kohr W, Aggarwal B, Goeddel D. 1994. Human tumor necrosis factor: Pre-cursor structure, expression, and homology to lymphotoxin. *Nature* 371(6259):724-729
- Perez C, Albert I, DeFay K, Zachariades N, Gooding L, Krieger M. 1990. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell*. 63(2) 251-258
- Perussia B. 1991. Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines. *Curr Opin Immunol*. 3(1) 49-55
- Pestka S. 1997. The human interferon-alpha species and hybrid proteins. *Semin Oncol*. 24(3 Suppl 9) S9-4-S9-17
- Fridog L, Redecha P, Teillaud J, Frey J, Fridman W, Sautes-Fridman C, Salmon J. 2001. Differential modulation of stimulatory and inhibitory Fc γ receptors on human monocytes by Th1 and Th2 cytokines. *J Immunol* 165(1) 531-537
- Radeke H, Janssen-Graafls I, Sowa E, Chouchakova N, Skokowa J, Loscher F, Schmidt R, Heeringa P, Gessner J. 2002. Opposite regulation of type II an III receptors for immunoglobulin G in mouse glomerular mesangial cells and in the induction of Anti-glomerular basement membrane (GBM) Nephritis. *J Biol Chem*. 277(30) 27535-27544
- Ravetch J, Bollard S. 2001. IgG Fc receptors. *Annu Rev of Immunol*. 19(1) 275-290
- Ravetch J, Luster A, Winkshank R, Kechan J, Pavlovic A, Portney D, Hulmes J, Pan Y, Unkeless J. 1985. Structural heterogeneity and functional domains of murine immunoglobulin G Fc receptors. *Science* 234(4777) 718-725
- Ravetch J. 1994. Fc Receptors: ruber redux. *Cell* 78(4) 553-560
- Ravetch J. 2002. A full complement of receptors in immune complex diseases. *J Clin Invest*. 110(12):1759-1761
- Regueiro J, López C. 1996. *Inmunología. Biología y Patología del sistema inmune*. 2 $^{\circ}$ ed. Editorial Medica Panamericana 198 pp.
- Robbins P, Evans C, Chernajovskiy Y. 2003. Gene therapy for arthritis. *Gene Ther*. 10(10) 902-911.
- Rodol J and Link D. 1996. Suppression of apoptosis during cytokine deprivation of 32D cells is not sufficient to induce complete granulocytic differentiation. *Blood* 87: 658
- Roederer M, Herzenberg L, Herzenberg L. 1995. Changes in antigens densities on leukocytes subsets correlate with progression of HIV disease. *Int Immunol*. 8(1) 1-11.
- Rossman M, Ruiz P, Cenber P, Gomez F, Rottem M, Schreiber A. 1993. Modulation of macrophage Fc gamma receptors by rmgM-CSF. *Exp Hematol*. 21(1):177-183
- Rudge E, Cutler A, Pritchard N, Smith K. 2002. Interleukin 4 reduces expression of inhibitory receptors on B cells and abolishes CD22 and Fc-RII-mediated B cell suppression. *J Exp Med*. 195(8) 1079-1085
- Rusconi F, Dubois C, Jacobsen S, Keller J. 1992. Transforming growth factor beta and interleukin-1: a paradigm for opposing regulation of haemopoiesis. *Baillieres Clin Haematol*. 5(3) 703-721

TESIS COMPLETA TESIS NO SALE
 FALLA DE ORIGEN

- Sad S, Marcotte R, and Mosmann T. 1995. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8⁺ T cells into cytotoxic CD8⁺ T cells secreting Th1 or T2 cytokines. *Immunity*. 2(3):271-279.
- Salmon J, Pricop L. 2001. Human receptors for immunoglobulin G: key elements in the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis Rheum*. 44(4):739-750.
- Sanchez X, Susiomi K, Cousins-Hodges B, Horton J, Navarro J. 1998. CXC chemokines suppress proliferation of myeloid progenitor cells by activation of the CXC chemokine receptor 2. *J Immunol*. 160(2):906-910.
- Sandor M, Galon J, Takacs L, Tatsumi Y, Mueller A, Sautes C, Lynch R. 1994b. An alternative Fc gamma₁-receptor ligand potential role in T-cell development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91(26):12857-12861.
- Sandor M, Hagen M, Lynch R. 1994a. Methods for studying Fc receptor expression. *Immunomethods*. 4(1):4-16.
- Sandor M, Lynch R. 1993. The biology and pathology of Fc receptors. *J Clin Immunol*. 13(4):237-246.
- Santiago E. 1996. Inducción a la expresión de receptores Fc por la interleucina-1 en células mieloides normales y leucémicas de ratón y humano. Tesis Doctorado en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM.
- Schindler R, Dinarello C. 1990. Interleukin-1. (Ed) Habenicht A. Growth factors, differentiation factors and cytokines. Springer-Verlag, Heidelberg. 192pp
- Schmid D, Tite J, Ruddle N. 1986. DNA fragmentation: manifestation of target cell destruction mediated by cytotoxic T-cell lines, lymphotoxin-secreting supernatant. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83(6):1881-1885.
- Sears D, Osman N, Tate B, McKenzie I, Hogarth P. 1990. Molecular cloning and expression of the mouse high affinity Fc receptor for IgG. *J Immunol*. 144(1):371-378.
- Sidhu R, Bollon A. 1993. Tumor necrosis factor activities and cancer therapy. A perspective. *Pharmacol Ther*. 57(1):79-128.
- Silvestre D, Ravetch J. 1994. Fc receptors initiate the Arthus reaction: redefining the inflammatory cascade. *Science*. 265(5175):1095-1098.
- Sivo J, Harmon J, Vogel S. 1995. Heat shock mimics glucocorticoid effects on IFN-gamma-induced Fc gamma R1 and Ia messenger RNA expression in mouse peritoneal macrophages. *J Immunol*. 156(9):3450-3454.
- Sivo J, Politis A, Vogel S. 1993. Differential effects of interferon-gamma and glucocorticoids on Fc gamma R gene expression in murine macrophages. *J Leukoc Biol*. 54(5):451-457.
- Smith R, Baglioni C. 1987. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem*. 262(15):6951-6954.
- Snoeck H, Van Bockstaele D, Nys G, Lenjou M, Lardon F, Haenen L, Rodrigus I, Peetermans M, Beremans Z. 1993. Interferon gamma selectively inhibits very primitive CD34 super(2+)/CD38 super(-) and not more mature CD34 super(+)/CD38 super(-) human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med*. 180(3):1177-1182.
- Stenmark S, Sunnemark D, Bucht A, Spøstødt A. 1999. Rapid local expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and gamma interferon after cutaneous *Francisella tularensis* infection in tularemia-immune mice. *Infect Immun*. 67(4):1789-1797.
- Sugarman B, Aggarwal B, Hass P, Figari I, Palladino M, Shepard H. 1985. Recombinant human necrosis factor alpha. Effects on proliferation of normal and transformed cells *in vitro*. *Science*. 230(4728):943-945.
- Szucs G, Kawai M, Kiss E, Csipo I, Szegedi G. 1995. Correlation of IgG Fc receptors on granulocytes with serum immune complex level in systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol*. 42(5):577-580.
- Takai T, Ono M, Hikida M, Ohmori H, Ravetch J. 1995. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. *Nature*. 375(6553):345-349.
- Takeda A, Tuazon C, Ennis F. 1983. Antibody-enhanced infection by HIV-1 via Fc receptor-mediated entry. *Science*. 242:4873:560-583.
- Tanaka S, Saito K, and Reed JC. 1993. Structure-function analysis of the bcl-2 oncoprotein, addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2b protein restores function as a regulator of cell survival. *J Biol Chem*. 268:10920.
- Taitour E, Pannetier C, Mathiot C, Teillaud J, Sautes C, Kourilsky P, Fridman W. 1995. Prognostic value of cytokine and soluble Fc gamma receptor assays in oncology. *Immunol Lett*. 44(2-3):145-148.
- Ting A, Karnitz L, Schoon R, Abraham R, Leibson P. 1992. Fc_γ receptor activation induces the tyrosine phosphorylation of both phospholipase C(PLC-γ) and PLC-γ2 in natural killer cells. *J Exp Med*. 176(5):1751-1755.
- Tracey K, Cerami A. 1994. Tumor necrosis factor a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med*. 45(1):591-503.
- Trinchieri G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol*. 13:251-276.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

- Trindandapani S, Siefker K, Teillaud J, Carter J, Wewers M, Anderson C. 2002. Regulated expression and inhibitory function of Fc γ RIIb in human monocytic cells. *J Biol Chem*. 277(7):5082-5089
- Ullman K, Northrop J, Verweil C, and Crabtree G. 1990. Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu. Rev. Immunol.* 8:421-452.
- Valone F, Kaufman P, Guyre P, Lewis L, Memoli V, Ernstoff M. 1995. Clinical trials of bispecific antibody MDX-overexpresses HER-2/neu. *J Hematother.* 4(5):471-475.
- van de Winkel J, Capel P. 1993. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today*. 14(5):215-221.
- Vely F, Gruel N, Moncuit J, Cochet O, Rouard H, Dare S, Galon J, Sautes C, Fridman W, Teillaud J. 1997. A new set of monoclonal antibodies against human Fc gamma RII (CD32) and Fc gamma RIII (CD16): characterization and use in various assays. *Hybridoma*. 16(6):519-528.
- Vlcek J, Palombella V, Henriksen-DeStephano D, Swenson C, Feinman R, Hirai R, Tsujimoto M. 1986. Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med*. 163(3):632-643.
- Wallace P, Howell A, Fanger M. 1994. Role of Fc gamma receptors in cancer and infectious disease. *J Leukoc Biol*. 55(6):815-826.
- Ware C, Crowe P, Grayson M, Androlewicz M, Browning J. 1992. Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells. *J Immunol*. 149(12):3881-3888.
- Weinschank R, Luster A, Ravetch J. 1988. Function and regulation of a murine macrophage-specific IgG Fc receptor. *Fc γ R-III*. *J Exp Med*. 167(6):1909-1925.
- Wisniewski D, Strife A, Aitzpodien J, Clarkson B. 1987. Effects of recombinant human tumor necrosis factor on highly enriched hematopoietic progenitor cell populations from normal human bone marrow and peripheral blood and bone marrow from patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*. 47(13):4788-4794.
- Wu Z, Markovic B, Chesterman C, Chong B. 1995. Characterization of IgG Fc receptors on CD34 antigen-expressing cell lines (KG-1 and KG-1a). *Immunol Cell Biol*. 74(1):57-64.
- Yonemura Y, Ku H, Hirayama F, Souza L, Ogawa M. 1995. Interleukin-3 or interleukin-1 abrogates the reconstituting ability of hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(9):4040-4044.
- Yoshikawa H, Sakihama T, Nakajima Y, Tasaka K. 1995. Costimulation of fibronectin receptor promotes Fc γ R-mediated rescue of IL-3-dependent bone marrow-derived cells from apoptosis. *J Immunol*. 156(5):1832-1840.
- Yoshikawa H, Sakihama T, Nakajima Y, Tasaka K. 1997. Fc γ RIII-mediated regulation of hematopoiesis in murine bone marrow cells by interleukin-3 and CD95 (Fas/Apo-1). *Blood*. 90(5):1911-1919.
- Zimner T, Jones P. 1990. Combined effects of tumor necrosis factor- α , prostaglandin E $_2$, and corticosterone on induced Ia expression on murine macrophages. *J Immunol*. 145(4):1167-1175.
- Zusman T, Lisansky E, Arons E, Anavi R, Bonnerot C, Sautes C, Fridman W, Witz I, Ran M. 1996. Contribution of the intracellular domain of murine Fc-gamma receptor type IIb1 to its tumor-enhancing potential. *Int J Cancer* 68(2):219-227.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN