



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL
ISOTIPO DE IgG SOBRE LA PRODUCCIÓN
DE CITOCINAS MEDIADA POR Fc γ R EN
MACRÓFAGOS DE RATÓN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A:
DULCE AURORA FRAUSTO DEL RÍO



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

México, D.F. 2005

m 350851



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente: Profra. María Magdalena Acosta y Segura
Vocal: Profra. Patricia Elvira Berrón Ruiz
Secretario: Prof. Enrique Ortega Soto
1er Suplente: Prof. Jorge Paniagua Solís
2º Suplente: Prof. Constantino III R. López Macias

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunología del cual es titular el Dr. Enrique Ortega Soto, perteneciente al Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.



Dr. Enrique Ortega Soto
ASESOR



Dulce Aurora Frausto Del Río
SUSTENTANTE

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo reconvencional.
NOMBRE: Dulce Aurora Frausto Del Río

FECHA: 4. XI. 05

FIRMA: Dulce Aurora Frausto

Este trabajo de tesis, como todo lo que hago
lleva mucho de ti, sin ti, seguramente
hubiera sido más difícil,
este logro es de nosotras.

Gracias mami,
yo sé que no es fácil
y que a veces no estás del todo convencida,
pero siempre estás ahí,
apoyándome.

Me enseñas que las cosas no son fáciles
pero también me haces sentir que
puedo lograrlas, me motivas.

Por que eres ejemplo de entrega,
de perseverancia y de tesón,
te quiero mucho mami.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *alma mater*.

A la Facultad de Química por ser parte fundamental en mi formación académica.

Al Dr. Enrique Ortega por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, desarrollando mi proyecto de tesis en el laboratorio del cual es titular, que pertenece al Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM; así como por asesorar mi trabajo de tesis.

Este trabajo se realizó con el apoyo económico de CONACYT (proyecto 45092) y la Dirección General de Personal Académico, DGAPA, UNAM (proyecto IN220705).

A las becas otorgadas por convenio con IVAX PHARMACEUTICALS MÉXICO, S.A. DE C.V., proyecto C/332/ABS y con CRYOPHARMA, S.A. DE CV, proyecto BM/200-2005.

A la M. en IBB Claudia A. Garay Canales por su apoyo técnico.

Mami, por que te debo todo lo que soy.

Gracias Elizabeth y Gis, este trabajo también se los dedico a ustedes, por que me han apoyado tanto y tantas veces, y durante los veinticuatro años que tenemos de conocernos, ambas han sido un ejemplo a seguir para mi, espero que estemos siempre juntas.
Las quiero mucho.

Gerardo, por que crecimos juntos, por que compartimos tantas cosas, tantas travesuras, juegos y secretos, te quiero mucho.

No sé a quien deba agradecerle, tal vez al destino, si es que existe, que acomodó una serie de eventos de tal modo que nos hiciera coincidir en espacio y tiempo; e hizo posible que me encontrara con ustedes, mis amigos, los mejores.

A mis ardillas Dianita y Mago, a Erika, a Clau, a la Gusa, a Belem, a Luis, a Gris, a Amilcar, a Israel, a Pedro, a Edgar, a Cris, a Jose Luis, a Batis y Aldo; por que compartimos desde ilusiones, alegrías, angustias y retos; hasta el merengue de los pasteles, nuestros desayunos a las 6:00 de tarde, las horas en la biblio (congelados para que la mamá de la Gusa no se percatara de nuestra presencia y nos pidiera amablemente que nos retiráramos), las cartitas a los reyes magos, kilos de churritos con chile después de Micro, sopes con cucaracha especial, bromas y carcajadas, borracheras, paseos, fogatas, elotes y palomitas quemados, los campeonatos de fut "con tu jefa" (¡las porras fueron parte fundamental de la motivación del equipo, sin eso no hubieran ganado!), por que exploramos juntos el paseo de la *Salmonella* exponiendo nuestras vidas, etc.
A todos los admiro, extraño y quiero mucho.

Mago: Yo sé que será muy difícil encontrar a alguien más con quien hacer tan buen equipo como contigo; mejor, quizá imposible. Aprendimos tanto juntas, nos conocíamos tan bien, que no necesitábamos hablar para saber que necesitaba la otra, no se me ocurre alguien más con quien hubiera querido compartir esta sinuosa y divertida travesía (o tal vez debería decir quimicotragicomedia, ¡ja!). Te quiero mucho amiga.

Victor, gracias por apoyarme, por estar conmigo en los momentos difíciles, por acompañarme, por alentarme, por hacerme reír cuando estoy triste, por los abrazos reconfortantes, te quiero mucho.

Dr. Enrique, por confiar siempre en mi, por apoyarme, por creer en mi, en algunas ocasiones más que yo, por ser mi maestro, por motivarme a seguir adelante, por tomar en cuenta mi opinión, por haberme recibido en su laboratorio, por haberme integrado a su equipo de trabajo y por siempre estar abierto a escuchar mis inquietudes y dispuesto a ayudarme, gracias.

Clau Garay, por tu tiempo, por tu paciencia, por sonreír siempre, por ser positiva y alegre.

Oswaldo y Linda, por hacer mi estancia en el laboratorio tan amena, gracias por las comidas en "las ensaladas", por compartir los postres, por las risas, por sus ocurrencias y divertidas travesuras.

Oswaldo: Aunque nunca te hayas ido, se te extraña. Ya en serio: gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme y a darme tu tiempo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
Capítulo 1 ANTECEDENTES	2
Capítulo 2 INTRODUCCIÓN	
1. Sistema fagocítico mononuclear.....	5
1.1. Características y funciones de las células del linaje monocito/macrófago en el sistema inmune.....	5
1.2. Sustancias producidas por los macrófagos	
1.2.1. Citocinas.....	8
1.2.2. Citocinas producidas por macrófagos.....	9
1.2.3. Fagocitosis y producción de citocinas.....	9
2. Anticuerpos	13
2.1. Inmunoglobulinas G.....	16
2.2. Diferencias estructurales y funcionales entre las subclases de IgG.	17
2.3. Región de la bisagra y flexibilidad: IgG de conejo y los diferentes isotipos de IgG de ratón y humano.	18
3. Receptores para Fc.....	20
3.1. Receptores para inmunoglobulina G.....	21
3.2. Sitios de unión de los anticuerpos a los FcγR.....	23
Capítulo 3 HIPOTESIS	24
OBJETIVOS	24
Capítulo 4 MATERIALES Y METODOS	25
Capítulo 5 RESULTADOS	34
Capítulo 6 DISCUSIÓN	45
Capítulo 7 CONCLUSIONES	50
ANEXO	
I. Líneas celulares.....	51
II. Medios de cultivo.....	51
III. Amortiguadores.....	52
IV. Soluciones para ELISA.....	53
V. Soluciones para tinción intracelular de citocinas.....	53
VI. Anticuerpos.....	54
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	55

Capítulo 1

ANTECEDENTES

Las repuestas mediadas por los receptores multicadena de reconocimiento inmune (MIRRs) participan de modo central en una gran variedad de procesos importantes en el sistema inmunológico. Los MIRRs incluyen al receptor para antígeno del linfocito T (TCR), el receptor para antígeno del linfocito B (BCR), el receptor de alta afinidad para la porción Fc de la IgE (FcεRI), el receptor tipo I de alta afinidad para la porción Fc de la IgG (FcγRI), los receptores tipo II y III de baja afinidad para la porción Fc de la inmunoglobulina clase G (FcγRII y FcγRIII) y el FcγRIV de afinidad intermedia. Estos receptores no tienen actividad enzimática intrínseca de cinasa, pero están acoplados a un sistema de señalización, de manera que, al unir a su ligando y ser agregados en la superficie celular, se inicia una señal bioquímica intracelular. Para comprender como la sola agregación de los receptores induce la activación de la cascada bioquímica de activación, se deben definir las propiedades estructurales y/o cinéticas de los agregados del receptor que determinan la intensidad de la señal, las características de los complejos protéicos formados como consecuencia de esta agregación y el papel de estos agregados en la transducción de señales.

Durante el estudio de las respuestas celulares inducidas por la agregación de los MIRRs se han empleado anticuerpos monoclonales específicos para la porción extracelular de los receptores, los cuales al inducir la agregación estimulan la respuesta celular. Esto ha permitido descifrar parte de las cascadas bioquímicas generadas y los requerimientos mínimos para activar a la célula. También se ha podido confirmar que cualquier ligando que sea capaz de inducir la agregación de los receptores genera respuestas celulares. Sin embargo, esta estrategia no ha permitido analizar cómo las diferencias en los agregados (en su estructura, tamaño, vida media, etc), inducidos por el ligando natural (complejos antígeno-anticuerpo: bacterias o células opsonizadas) afectan el proceso. Es posible que diferencias en la configuración espacial de los agregados del receptor se reflejen en su capacidad para inducir la activación celular (Ortega, 1995). Algunos resultados experimentales apoyan esta hipótesis:

Al estimular al BCR usando antígeno, anticuerpos anti-inmunoglobulina (Ig) o anticuerpos anti-Ig unidos a fase sólida, se generan respuestas distintas (Pleiman, 1994). Lo mismo ocurre si se estimula al TCR usando anticuerpos que reconocen distintos epítopes del complejo CD3, que es una de las subunidades del TCR. Estas diferencias casi se igualan al

entrecruzar estos anticuerpos con un segundo anticuerpo que los reconozca (Jeddi-Tehrani, 1992).

Si la estimulación involucra al Fc ϵ RI y se usan anticuerpos que reconocen distintos epítopes de la subunidad α del receptor, también se inducen respuestas cuantitativamente distintas. Las respuestas se igualan a la respuesta generada por el antígeno si se usan fragmentos Fab de estos anticuerpos y después se entrecruzan usando un segundo anticuerpo que reconozca los fragmentos (Ortega *et al.*, 1988). Este fenómeno se observó al analizar distintas funciones efectoras como son la secreción y la producción de ácido araquidónico y de leucotrieno C₄ (Ortega *et al.*, 1989a). Al analizar la movilidad rotacional de los complejos anticuerpo-Fc ϵ RI formados por cada anticuerpo sobre la membrana de la célula, se determinó que existe una relación inversa entre la movilidad del complejo Fc ϵ RI-anticuerpo anti-Fc ϵ RI y la secreción; es decir, los complejos Fc ϵ RI-anticuerpo que presentaron mayor movilidad rotacional fueron los menos eficientes para inducir secreción (Pecht, 1991). Estos datos sugieren que las diferencias observadas en los ensayos de secreción se deben a que la configuración de los dímeros de Fc ϵ RI formados por cada anticuerpo es distinta. Las diferencias estructurales entre los dímeros se reflejan en la forma en que activan vías de señalización involucradas en la síntesis de inositol 1,4,5- trifosfato, la movilización de Ca²⁺ y la formación de puntos de adhesión focal. Al analizar las respuestas bioquímicas inducidas por estos anticuerpos se identificó un paso de regulación en las señales inducidas por el Fc ϵ RI desconocido hasta ese momento. Este paso de regulación involucra la disociación de la cinasa Lyn de los complejos de los receptores agregados (Ortega *et al.*, 1999).

En el laboratorio se han encontrado diferencias en la fagocitosis mediada por Fc γ Rs de macrófagos murinos (línea celular J774), relacionadas con la subclase de IgG. Cuando se opsonizan eritrocitos con anticuerpos del isotipo IgG2b la fagocitosis es más eficiente que cuando se opsoniza con anticuerpos de isotipo IgG1 (Garay, 2002). Se ha demostrado que la señal inducida por anticuerpos de la subclase IgG1 induce a los 5 minutos de estimulación la actividad máxima de la cinasa Syk; mientras que la señal inducida por la subclase IgG2b activa a la cinasa Syk desde el minuto de estimulación (Santoyo, 2002). Esto nos habla de que quizá la estructura del agregado dependa de las características estructurales de la inmunoglobulina que indujo dicha agregación, y que a su vez de ello dependa la activación de las funciones efectoras. Entonces, si la conformación de los agregados influye en la respuesta efectora, y los isotipos presentan diferencias en su estructura, quizá la activación e intensidad de las respuestas celulares se encuentren influenciadas por el isotipo de inmunoglobulina que induce

la agregación de receptores, dado que es posible que produzcan agregados de conformación distinta.

El proyecto que se desarrolló para esta tesis tenía como objetivo aportar más información al estudio de la participación del isotipo en la respuesta celular, analizando la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL6 y TNF- α) en respuesta al entrecruzamiento de Fc γ Rs inducido por partículas recubiertas con IgG de distinto isotipo.

INTRODUCCIÓN

1. El sistema fagocítico mononuclear

El sistema fagocítico mononuclear está formado por los monocitos, sus precursores en la médula ósea y dos poblaciones de células diferenciadas derivadas de los monocitos: los macrófagos y las células dendríticas de origen mieloide. Todas estas células, como todas las células sanguíneas, provienen de la médula ósea. Los monocitos se originan de un precursor mieloide pluripotencial (Unidad formadora de colonias de granulocitos-eritrocitos-megacariocitos-macrófagos, GEMM-CFU), que se diferencia a un precursor de granulocito-macrófago (unidad formadora de colonias granulocitos-macrófagos, GM-CFU), luego a precursor monocítico (M-CFU), monoblasto, promonocito y finalmente monocito, el cual abandona la médula ósea y sale a circulación. Algunos de los monocitos sanguíneos migran y se instalan en los tejidos, en donde se diferencian a macrófagos, cuyo nombre así como su morfología y otras características fenotípicas dependerán del tejido donde residen.

Los monocitos se observan al microscopio óptico como células pequeñas de 12-15 μm de diámetro; con núcleo reniforme que ocupa el 50% del volumen de la célula. Durante la transición de monocito a macrófago, hay un aumento en el número de mitocondrias, en la actividad de varias enzimas y complejos enzimáticos, en la tasa de respiración celular, en el número de lisosomas y enzimas lisosomales; aumenta además su capacidad fagocítica, la expresión de receptores para IgG y C3, y aumentan de tamaño, alcanzando de 25-50 μm de diámetro. Los macrófagos en general presentan un núcleo excéntrico, redondo o arriñonado. En este estadio la síntesis de DNA decrece significativamente (Lewis, 1992; Auger, 1992)

1.1 Características y funciones de las células del linaje monocito / macrófago en el sistema inmune

Las actividades de monocitos y macrófagos pueden dividirse en tres categorías: (1) mantenimiento de los tejidos, (2) regulación de la respuesta inmune y (3) control de patógenos. La **tabla 1** resume algunas de estas actividades.

El papel de los macrófagos en el mantenimiento de los tejidos consiste en la reparación y remodelación. Por ejemplo, en el hueso, los osteoclastos son los responsables de la remoción de las células óseas para que puedan ser sustituidas por células nuevas. En el sistema inmune,

los monocitos y macrófagos juegan un papel central en la regulación de la respuesta inmune, actuando como células accesorias, coordinando la interacción de células T y B durante la presentación de antígeno. Además, no sólo procesan antígeno, también secretan una serie de citocinas y quimiocinas que modulan positiva o negativamente la función linfocítica. Por último, las actividades antimicrobianas de monocitos y macrófagos incluyen sus propiedades antibacterianas, antiparasitarias, fungicidas y antivirales (Lopez-Berestein, 1993) que le confieren la producción de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno y enzimas proteolíticas; todas estas sustancias producidas en respuesta a la presencia de un patógeno.

Muy pocas de estas funciones son expresadas constitutivamente, por lo que se requiere una señal exógena, como puede ser cierta citocina, la interacción con una célula T o algún componente de la matriz extracelular, para que el macrófago lleve a cabo la síntesis de citocinas o el estallido respiratorio por ejemplo, mecanismos que tienen por objetivo la eliminación de un patógeno.

Tabla 1. Funciones de los macrófagos en la respuesta inmune innata y adaptativa

Función	Receptor involucrado	
	Inmunidad innata	Inmunidad adaptativa
Reconocimiento y fagocitosis de células propias dañadas o agentes infecciosos (células tumorales, apoptóticas y viejas, así como microorganismos)	TLRs, receptores de manosa, receptores scavenger, receptores para complemento, etc.	Receptores para la porción Fc de inmunoglobulinas, los FcRs (unión de partículas opsonizadas con anticuerpos).
Expresión de vías efectoras antimicrobianas y tumorocidas	Intermediarios reactivos de oxígeno (*NADPH oxidasa), intermediarios reactivos de nitrógeno (activación de la óxido nítrico sintasa inducible por citocinas), enzimas lisosomales, péptidos y proteínas antimicrobianas (lisozimas, proteínas incrementadoras de la permeabilidad microbiana, defensinas), depleción de triptófano y hierro, acidificación del fagolisosoma dependiente de ATPasa.	
Producción de citocinas y mediadores solubles.	*IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, *IFN α/β , *IFN γ , *TNF, *bFGF, *VEGF, *TGF β , quimiocinas, prostaglandinas, leucotrienos y enzimas.	
Presentación de antígeno y estimulación de células T.	Expresión de complejos moléculas de clase II/péptidos, expresión de proteínas coestimuladoras.	

* NADPH, nicotinamida dinucleótido fosfato (reducido), bFGF, factor de crecimiento básico de fibroblastos; VEGF, factor de crecimiento del endotelio vascular; TGF, factor de crecimiento tumoral; IL, interleucina; IFN, interferon; TNF, factor de necrosis tumoral (Modificada de Bogdan C, 2001).

Para poder llevar a cabo estas actividades los macrófagos cuentan con un repertorio de receptores entre los que destacan los descritos en la **tabla 2**.

Tabla 2. Principales receptores expresados en macrófagos, sus ligandos y sus funciones.

Receptor	Ligandos (ejemplos)	Función
CD14	LPS, LTA muramil dipéptido, péptidoglicano soluble, polisacáridos de pared celular de <i>Streptococcus</i> , lipoarabinomanana micobacteriana, células apoptóticas.	Reconocimiento de patógenos y fagocitosis, eliminación de células apoptóticas.
CD36(receptor scavenger, familia B)	Colágena tipo I, trombospondina, fosfatidilserina.	Deposición de lipoproteínas-colesterol, unión y eliminación de células apoptóticas.
CR1 CR3 (CD11b/CD18, Mac-1) CR4	C3b, C4b, C3i C3bi, CD54 (ICAM-1); fibrinógeno, ligandos microbianos, oligodesoxinucleótidos C3bi	Internalización de microorganismos opsonizados y sin opsonizar; interacción macrófago-célula T (*CR3); inhibición de producción de IL-12 (CR3)
FcγRs	IgG	Internalización de microbios opsonizados, activación (FcγR I, IIA III y IV) o inhibición (FcγR IIB) de macrófagos.
Receptores a manosa	Oligosacáridos de manosa y fucosa	Reconocimiento de patógenos y fagocitosis.
Receptores scavenger clase A	Polianiones (dextran por ejemplo), *LTA, lipoproteínas de baja densidad acetilados u oxidados.	Reconocimiento de patógenos y fagocitosis. Deposito de colesterol(formación de placas arteroescleróticas), inhibición de producción de IL-2.
Proteína reguladora de señal α _v (SIRPα)	CD47 (integrina asociada a proteína, IAP)	Agregación homotípica de macrófagos; interacción de macrófagos con células T, activación de macrófagos, inhibición de fagocitosis o eritrocitos propios.
TLR2	*LTA, *PGN, *BLP, *MALP; *LAM, lipoproteína de 19-kDa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; levaduras.	Unión a productos microbianos; unión de microbios intactos, activación de macrófagos.
TLR4	*LPS	
TLR5	Flagelina de <i>Listeria monocytogenes</i>	
TLR6	*MALP	
TLR9	Oligonucleótidos bacterianos de CpG	
Receptor vitronectina (α _v β ₃)	Trombospondina, vitronectina, laminina, fibronectina	Estimulación de polimerización de actina (fagocitosis de células apoptóticas)

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

Los macrófagos expresan además MHC-II y otras proteínas de membrana que actúan como co-estimuladoras, lo que les confieren la capacidad de presentar antígeno a los linfocitos T (Bogdan C, 2001).

1.2 Sustancias producidas por los macrófagos

Los macrófagos son una importante fuente de citocinas, estas sustancias regulan las funciones y comunicación celulares. Por ello, antes de abundar en la gama de citocinas que producen los macrófagos se hará una breve descripción de las características de estas moléculas.

1.2.1 CITOCINAS

Las citocinas pueden describirse como “proteínas mensajeras” que son los principales mediadores solubles de comunicación entre las células del sistema inmune. Se trata de polipéptidos de tamaño pequeño (aprox. 8-80 kDa) que usualmente actúan en forma autócrina o parácrina (afectan a la misma célula que la produce o a células vecinas, respectivamente). La producción de citocinas es transitoria, breve y estrictamente regulada. La unión de la citocina a su receptor celular desencadena respuestas que inducen, aumentan o inhiben la expresión de ciertos genes, modificando así el comportamiento de la célula blanco (Balkwill F, 2001).

Las citocinas son producidas en respuesta a microorganismos, a sustancias secretadas por ellos o por la presencia de otras citocinas, y tienen la función de regular la respuesta inmune y las reacciones inflamatorias (Abbas, 2003).

La nomenclatura de distintos grupos de citocinas se basó inicialmente en la fuente celular, por ejemplo las linfoquinas, las monocinas, etc., pero dado que se ha descubierto que la producción de cierta citocina no es exclusiva de un tipo celular, se ha elegido el término citocina para referirse genéricamente a estos mediadores celulares.

Aunque las citocinas son estructuralmente diversas, además de las ya descritas, comparten otras propiedades:

- Las actividades biológicas de las citocinas son frecuentemente pleiotrópicas, redundantes, sinérgicas o antagónicas.
- Pueden tener acción local (autócrinas o parácrinas) o sistémica (endócrinas).
- La expresión de los receptores de citocinas es regulada por señales externas, y como consecuencia, la respuesta de las células ante las citocinas (Abbas, 2003).

Además de clasificarse por su origen, las citocinas pueden agruparse de acuerdo con su actividad biológica:

1. Citocinas mediadoras y reguladoras de la inmunidad innata. Producidas principalmente por fagocitos mononucleares en respuesta a productos bacterianos como LPS, o productos virales como RNA de doble cadena. Muchas de estas citocinas actúan sobre células endoteliales y leucocitos para estimular la inflamación y controlar esta respuesta.

2. Citocinas mediadoras y reguladoras de la inmunidad adaptativa. Son producidas principalmente por linfocitos T tras el reconocimiento específico de antígenos.

3. Citocinas con actividad estimuladora de hematopoyesis. Son producidas por células estromales de la médula ósea, leucocitos y otras células. Estimulan el crecimiento y diferenciación de leucocitos inmaduros.

1.2.2 Citocinas producidas por macrófagos

Los macrófagos son una importante fuente de citocinas, que funcionalmente se pueden dividir en los siguientes grupos:

1. Las que median la respuesta inflamatoria (reclutamiento de células inflamatorias): IL-1, TNF, quimiocinas CC y CXC, IL-8 y proteína quimiotáctica de monocitos 1.
2. Las que median la activación de células T y NK: IL-1, IL-12, IL-8.
3. Autocrinas: IL-1, TNF, IL-12, IL-18, IFN α/β , IFN γ .
4. Las que regulan negativamente al macrófago y/o ayudan a poner fin a la reacción inflamatoria: IL10, TGF β .

Además, los macrófagos secretan hormonas polipeptídicas y esteroides, factores de coagulación (VII, IX, X, V), enzimas (DNAsas, RNAsas, fosfatasas, glicosidasas, sulfatasas, arginasas), glutatión, así como una gran diversidad de factores de crecimiento (Leenen P and Campbell P, 1993). Aunque la síntesis de complemento la llevan a cabo principalmente los hepatocitos, las células de Kupffer también contribuyen a ello bajo el estímulo de IL-1, IL-6 y TNF- α (Lappin, 1993), produciendo el Factor B, Factor D y los componentes C1-C9.

La producción de citocinas puede ser activada por productos microbianos como LPS, por interacción con células T_{H1}, por factores solubles incluyendo prostaglandinas, leucotrienos, y otras citocinas como IFN γ , etc. (Bogdan C, 2001).

1.2.3. Fagocitosis y producción de citocinas

La producción de citocinas bien puede anteceder a la fagocitosis, proceso que consiste en la internalización de partículas relativamente grandes (>0.5 μm) por un mecanismo que involucra el rearreglo del citoesqueleto (Aderem, 1999). La fagocitosis inicia con el reconocimiento de moléculas presentes en la superficie del microorganismo, a través de receptores de membrana del macrófago. Este reconocimiento puede involucrar directamente a moléculas del microorganismo, como manosa por ejemplo, o bien indirectamente a moléculas unidas a la partícula, como ocurre con algunas opsoninas (inmunoglobulinas o fragmentos de componentes

del complemento) que son reconocidas en la superficie del macrófago y facilitan la internalización de los antígenos (Greenberg, 1993).

En los siguientes párrafos se mencionarán algunas características de las principales citocinas producidas por los macrófagos.

A. TNF- α

El TNF se identificó en sueros de animales tratados con LPS como una sustancia con la capacidad de causar la necrosis de tumores *in vivo*. Ahora se sabe que el efecto del TNF sobre el tumor no es directo, sino que se debe a que el TNF actúa sobre la microvasculatura de tumor activando la coagulación, suprimiendo la actividad de integrinas y produciendo la apoptosis de las células endoteliales que forman los vasos que alimentan al tumor, es decir interfiere en la angiogénesis (Grell y Scheurich, 2001).

El TNF es llamado TNF- α por razones históricas para distinguirlo del TNF- β o linfoxina que tiene propiedades citotóxicas similares pero que producen los linfocitos derivados de timo (LT α) (Grell y Scheurich, 2001). La mayor fuente celular de TNF- α son los fagocitos mononucleares activados, aunque las células T estimuladas con antígeno, células asesinas naturales (NKs) y células cebadas secretan esta proteína también. El estímulo más potente que induce la producción de TNF- α en macrófagos es el LPS; el IFN- γ producido por los linfocitos T o las NKs aumenta la síntesis de TNF- α estimulada por LPS (Abbas, 2000).

En fagocitos mononucleares, el TNF es sintetizado como una proteína de membrana tipo II, no glicosilada, que posee dos dominios extracelulares, con residuos de cisteína conservados; contiene una región de unión al ligando y otra de transducción de señales. La porción intracelular es el extremo amino terminal y la cadena extracelular contiene el carboxilo terminal. Es expresado como un homotrímero y es ligando del receptor TNFR II. Fragmentos de 17kDa de cada subunidad son generados proteolíticamente sobre la membrana plasmática del macrófago por una metaloproteínasa unida a la membrana, produciendo la forma secretada de TNF, que circula como un homotrímero estable en forma de pirámide de 51 kDa. La unión a su receptor es por una de las bases de esa pirámide de manera que una molécula tiene la capacidad de unirse a más de un receptor. El TNF puede unirse a dos familias de receptores: los TNFR I y el TNFR II. Si se une a la familia de los TNFR I induce el reclutamiento de proteínas adaptadoras que activan la vía de las caspasas y con ello la apoptosis y también puede generar la activación de factores de transcripción. Si se une al TNFR II produce la unión de proteínas llamadas factores asociados al receptor de TNF (TRAFs) al dominio citoplasmático del receptor y

finalmente la activación de factores de transcripción como NF- κ B y la proteína de activación 1 (AP-1) (Abbas, 2000).

El principal papel fisiológico del TNF es estimular el reclutamiento de neutrófilos y monocitos a los sitios de infección y la activación de esas células para erradicar al patógeno (Abbas, 2000). El factor de necrosis tumoral es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda a la infección por bacterias Gram negativas y otros microorganismos infecciosos. Los efectos del TNF incluyen la inducción de la secreción de mediadores solubles, la inducción de la expresión génica, efectos citotóxicos e inhibición del crecimiento. Activa el endotelio para la expresión de moléculas de adhesión y actividad procoagulante. Aumenta la expresión de moléculas de clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad. Es responsable de muchas de las complicaciones en infecciones severas (Grell y Scheurich, 2001).

B. INTERLEUCINAS

Las interleucinas son citocinas producidas por leucocitos (por ejemplo macrófagos o células T) que actúan sobre otros leucocitos. Éste término no es del todo adecuado actualmente porque muchas citocinas que únicamente son sintetizadas por leucocitos y que actúan sobre ellos mismos no llevan este nombre por cuestiones históricas, y otras citocinas que son producidas y actúan en otras células también son llamadas interleucinas; sin embargo el término se usa para mantener la nomenclatura estándar (Abbas, 2003)

B.1 IL-1: IL-1 α e IL-1 β

La IL-1 es un mediador de la inflamación producida por el hospedero en respuesta a estímulos infecciosos e inflamatorios. Actúa junto con el TNF en la respuesta inmune innata e inflamatoria. La mayor fuente celular de IL-1 así como de TNF son los fagocitos mononucleares activados. La producción de IL-1 es inducida por productos bacterianos como LPS y por otras citocinas como TNF. A diferencia de TNF, la IL-1 es producida por varios tipos celulares como macrófagos, neutrófilos, células epiteliales (por ejemplo keratinocitos) y células endoteliales.

Existen dos formas de IL-1, denominadas α y β , que tienen al menos 30 % de homología. Ambas formas se unen al mismo receptor y median las mismas actividades biológicas. Ambas son polipéptidos que se generan como precursores de 33kD y son secretados como moléculas maduras de 17kD; la IL-1 β requiere de la proteólisis por la IL-1 β convertasa para ser activa, en cambio la IL-1 α es activa aún como precursor. Se han caracterizado dos receptores diferentes para esta citocina, ambos de la superfamilia de las inmunoglobulinas. El receptor tipo I es expresado en todos los tipos celulares y es el principal receptor de IL-1, el tipo II se expresa en células B, puede ser inducido en otros tipos celulares, pero no induce respuesta a IL-1. La

porción citoplásmica de IL-1R es homóloga a la de los receptores tipo Toll. La unión de IL-1R/IL-1 lleva a la activación de una cinasa llamada cinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK) y como paso final a la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1.

Los efectos biológicos son similares a los inducidos por el TNF y dependen de la cantidad de citocina producida:

- A bajas concentraciones media la inflamación, sobre células endoteliales incrementa la expresión de moléculas de superficie que median la adhesión de leucocitos (como ligandos de integrinas por ejemplo).
- En altas concentraciones tiene efectos endócrinos. Sistémicamente comparte con TNF la capacidad de producir fiebre, inducir la síntesis de proteínas de la fase aguda en el hígado e iniciar el gasto metabólico (caquexia) (Abbas, 2003).

C. IL-6

La IL-6 fue descubierta en el suero de pacientes con inflamación. Es un monómero protéico glicosilado de 186 aminoácidos, con un peso molecular de 19-26 kD. Es producido por una amplia variedad de tipos celulares, pero principalmente por macrófagos, células endoteliales y linfocitos T (Abbas, 2003). Su producción puede ser inducida por IL-1 y TNF en fibroblastos, células endoteliales, keratinocitos, astrocitos, células T y B; en monocitos se induce bajo estimulación con LPS e IL-1 α , TNF, IFN γ y GM-CSF y se inhibe por glucocorticoides. La IL-6 es un factor de diferenciación del estado tardío de células B en transición a células plasmáticas, aumenta la proliferación de ellas e incrementa la secreción de IgM, IgG e IgA. La IL-6 regula la proliferación de células T y la diferenciación de linfocitos T citotóxicos. Esta interleucina puede inhibir la secreción de IL-1 y TNF mientras que activa a los monocitos (y neutrófilos) para el estallido respiratorio. La IL-6 tiene varias actividades en la hematopoyesis. Uno de los principales papeles de la IL-6 *in vivo* aparentemente es el inicio de la fase hepática aguda durante la inflamación. Está además involucrada en la remodelación del tejido a través de sus efectos sobre el tejido conectivo, proteasas e inhibidores de proteasas. Es capaz de influir en el sistema neurológico y producir fiebre (Mire-Sluis AR, 2001).

2. Anticuerpos/Inmunoglobulinas

Estructura y funciones

Los anticuerpos son moléculas antígeno específicas, presentes en el plasma y fluidos extracelulares, producidas por las células B en respuesta a la infección. Entre las actividades que pueden llevar a cabo en contra de un agente invasor se encuentran: la inactivación de toxinas, la neutralización de virus, opsonización, activación del complemento por la vía clásica y activación de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) por células NKs, neutrófilos y macrófagos. Los anticuerpos son proteínas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, ya que están compuestos por dominios de inmunoglobulina, que consisten en arreglos de dos capas antiparalelas de cadenas β plegadas unidas por un puente disulfuro. Las moléculas que poseen en su estructura dichos dominios pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas; en esta familia también se encuentran otras moléculas encargadas del reconocimiento de antígeno y de interacciones célula-célula, como los TCR, BCRs y moléculas del MHC (Janeway, 1999).

La estructura fundamental de los anticuerpos consiste en dos pares de cadenas polipeptídicas: un par de cadenas “pesadas” (Heavy) y otro par de cadenas “ligeras” (Light), cada par idéntico entre sí, que se mantienen unidas a través de múltiples interacciones no covalentes y puentes disulfuro. Cada segmento homólogo tiende a formar de manera independiente estructuras compactas, los dominios de inmunoglobulina antes mencionados (Metzger, 1990).

Los anticuerpos tienen dos funciones principales: (1) unirse específicamente a las moléculas del patógeno que inició la respuesta inmune y (2) reclutar células y/o moléculas que destruyan al patógeno una vez unido el anticuerpo. Estas funciones están estructuralmente separadas en la molécula de anticuerpo, una parte reconoce específicamente al antígeno y la otra inicia los mecanismos efectoros. La región del anticuerpo que posee la especificidad para el antígeno es la región variable (V) y la porción del anticuerpo cuya estructura se comparte entre moléculas del mismo isotipo es la región constante (C) (Janeway, 1999).

Se han establecido, a través de proteólisis enzimática con papaína, dos regiones en los anticuerpos, denominadas fracción de unión al antígeno o Fab (por sus siglas en inglés), constituido por los dominios V_H , C_{H1} , V_L , C_L ; y la fracción cristalizable o Fc, formado de los dominios C_H restantes (el número de dominios constantes que constituyan el Fc dependerá del isotipo de anticuerpo; para la IgG, IgA e IgD son del C_{H2} - C_{H3} , mientras que para la IgM e IgE son del C_{H2} - C_{H4}). Entre el dominio C_{H1} y C_{H2} se encuentra la bisagra, que es la que provee de flexibilidad a la molécula, la cual está formada de cerca de 60 residuos (el número es variable dependiendo del isotipo) ricos en prolina, serina, treonina y cisteína, a partir de este último se

forman puentes disulfuro, que mantienen unidas las cadenas pesadas entre sí. Las regiones ya descritas se presentan esquematizadas en las **figuras 1 y 2**.

Existen diferentes clases de anticuerpos, definidos por la estructura de sus cadenas pesadas, lo que determina la actividad funcional de la molécula. Hay cinco clases principales de cadenas pesadas o bien cinco isotipos, algunos de los cuales se subdividen en subtipos. Las cinco clases son: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, y sus cadenas pesadas son denotadas con las letras griegas: γ , α , μ , δ y ϵ , respectivamente (Janeway, 1999). Los diferentes isotipos difieren en el grado de libertad de movimiento de sus Fabs, dado que la bisagra es más o menos larga en cada isotipo, lo que les confiere distinta flexibilidad (Metzger, 1990). Además difieren en el número y localización de puentes disulfuro, de los sitios de glicosilación, en el número de dominios constantes (Janeway, 1999), en su abundancia en los fluidos fisiológicos y en su capacidad de fijar complemento y de mediar fagocitosis.



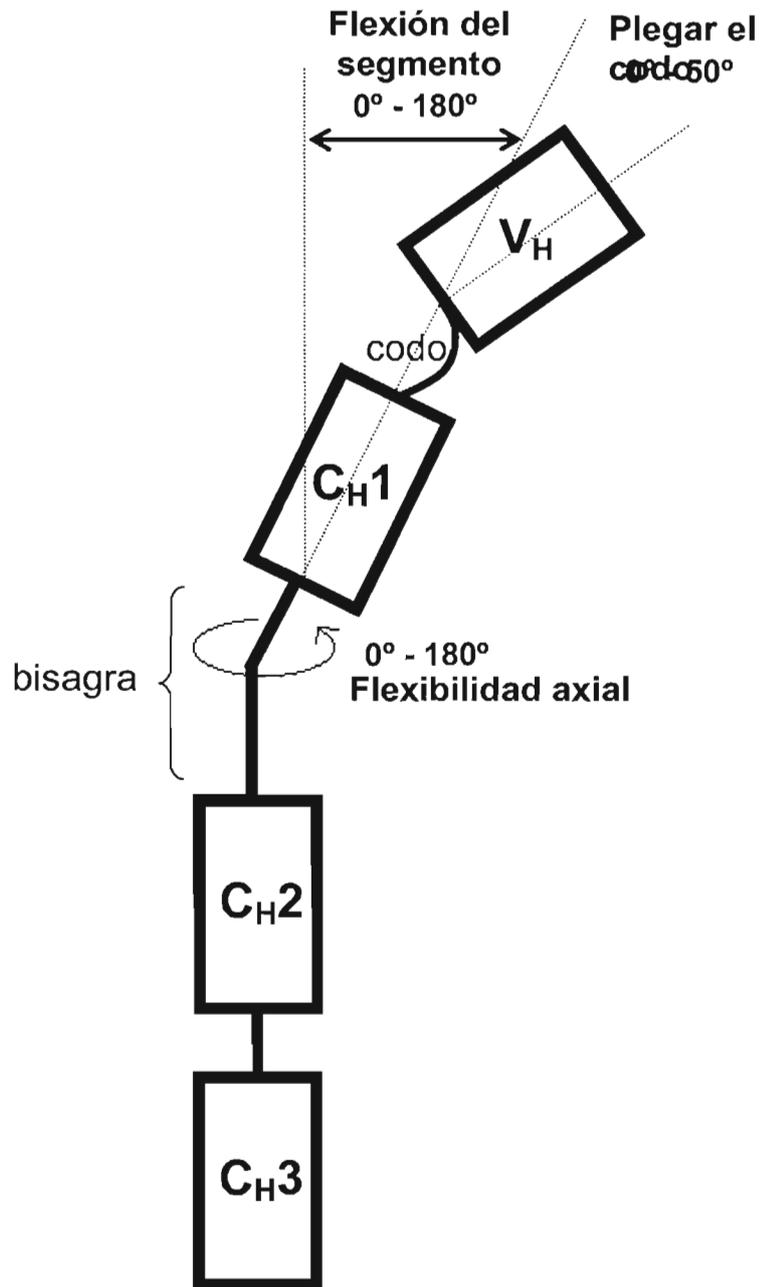


Fig. 1 . Esquema de la movilidad del Fab. Los dominios de inmunoglobulina están representados como rectángulos. La flexibilidad segmental está determinada por la bisagra y se mide como el ángulo entre los ejes simétricos del F_c y F_{ab} ; la microscopía electrónica revela ángulos entre 0 y 180 grados. La flexibilidad axial también está determinada por la bisagra y da giros sobre el eje de F_{ab} (Modificado de Kolar GR y Capra JD, 2003).

2.1. Inmunoglobulina G

Constituye el isotipo más abundante en la sangre (el 75 % de las inmunoglobulinas en el suero son de clase IgG) así como en la linfa y el fluido peritoneal. Tiene una vida media en el suero de tres semanas; lo que lo posiciona como el anticuerpo más estable del suero (Kolar GR y Capra JD, 2003).

Las IgGs pesan entre 140-160 kDa; tienen la capacidad de fijar complemento, sirven de opsonina (ya que los macrófagos y otros fagocitos tienen receptores membranales para la porción Fc), y son los únicos anticuerpos que atraviesan placenta (Janeway, 1999).

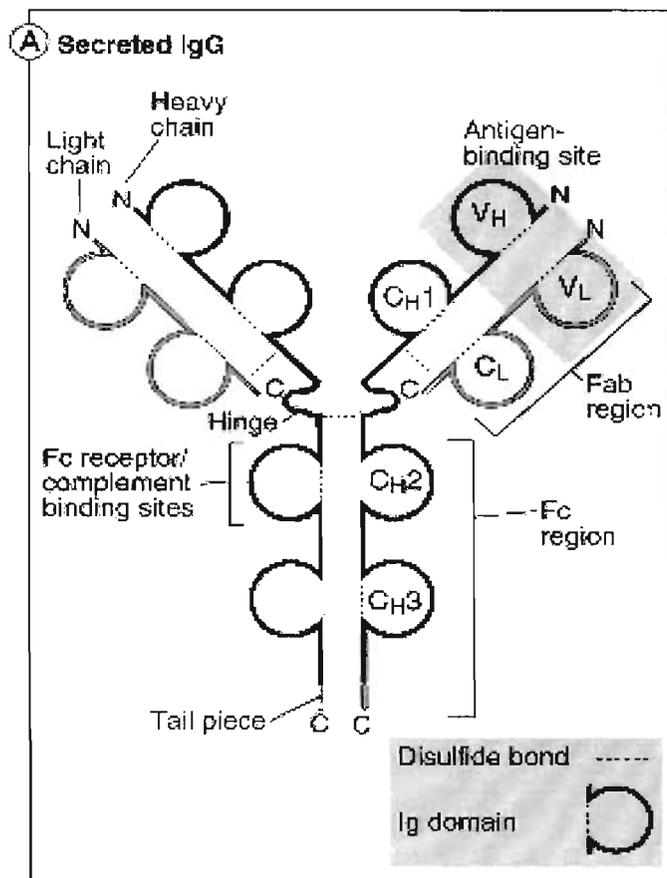


Figura 2. Inmunoglobulina G

2.2. Diferencias estructurales y funcionales entre subclases de IgG

Aunque la estructura y secuencia de las diferentes subclases de IgG son muy semejantes, existen diferencias importantes en función tanto *in vitro* como *in vivo*. En los siguientes párrafos vamos a referirnos a las diferencias estructurales y funcionales descritas en ensayos *in vitro* con estas subclases de inmunoglobulinas.

Se han descrito 4 subclases de IgGs murinas, de las cuales las más abundantes son la IgG1 y la IgG2a, mientras que la IgG2b y la IgG3 se encuentran en menor concentración. Dangl y colaboradores encontraron que entre las IgGs de ratón la subclase más rígida es la IgG1, lo cual atribuyen a que tiene la región de la bisagra más corta lo que le da menor libertad de movimiento. Las diferentes subclases de IgG difieren en la estructura de la región constante de sus cadenas pesadas, incluyendo diferencias en la longitud de la bisagra, antes mencionada, así como en el número de puentes disulfuro en esta misma zona. Las cadenas pesadas de IgG3 están unidas por dos puentes disulfuro intercadena, mientras que las otras moléculas de IgG tienen tres puentes.

Las diferentes subclases de IgG comparten una larga vida media, lo que facilita su permanencia en altas concentraciones en el suero (Nezlin, 1998).

El complemento es fijado a través de la vía clásica más eficientemente por IgG2a e IgG2b de ratón (Neuberger, 1981) e IgG1 e IgG3 en el humano (Bruggermann *et al.*, 1987; Dangl *et al.*, 1988); pero la actividad de fijación de complemento de IgG1 e IgG3 de ratón (Oi *et al.*, 1984) y la IgG2 en humanos (Waldmann, 1989) es débil o ausente por completo.

Diferentes estímulos antigénicos inducen la producción preferente de algunas subclases de IgG. Los antígenos en forma de proteínas solubles estimulan predominantemente una respuesta de IgG1 en ratón (Slack, 1980); mientras que los carbohidratos inducen principalmente a una respuesta de IgG3 en el ratón, y de IgG2 en el humano. Los virus inducen principalmente producción de anticuerpos IgG2a en ratones, e IgG1 e IgG3 en humanos. Las bacterias Gram-negativas inducen predominantemente respuesta IgG1 en ratón e IgG4 en humano (Nezlin, 1998).

2.3. Región de la bisagra y flexibilidad:

IgG de conejo y los diferentes isotipos de IgG de ratón y humano.

Se ha reportado la existencia de un sólo isotipo de IgG en conejos, mientras que para ratón y humano se sabe de la existencia de cuatro isotipos distintos (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3; IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4, respectivamente). Se han realizado estudios para establecer diferencias tanto estructurales como funcionales entre las subclases de anticuerpo y entre especies, las que incluyen comparaciones en la longitud de la bisagra, y su correlación tanto con la capacidad de fijar complemento como con su flexibilidad (ver **figura 3** y **tabla 3**). Los resultados se presentan condensados en la **tabla 3**.

Dangl y colaboradores asumen que entre más larga sea la región de la bisagra, mayor será su flexibilidad y por lo tanto mayor la capacidad de adoptar diferentes conformaciones, ya que además la longitud de la bisagra reduce el impedimento estérico que los Fabs presentan para el acceso al C_H2 que se requiere en las interacciones con otras moléculas, como las del complemento, por ejemplo. Sus datos muestran una correlación entre la flexibilidad de las moléculas y su eficiencia para inducir la fijación de complemento. Por ejemplo, coincide que la IgG1 de ratón, que tiene la región de la bisagra más corta y es la que tiene la menor velocidad de decaimiento de anisotropía de las IgGs de ratón (**figura 2A**) -lo que indica que es la menos flexible-; es la que requiere mayor concentración de antígeno sobre la superficie de las plaquetas (**tabla 3**) para unirse y fijar complemento.

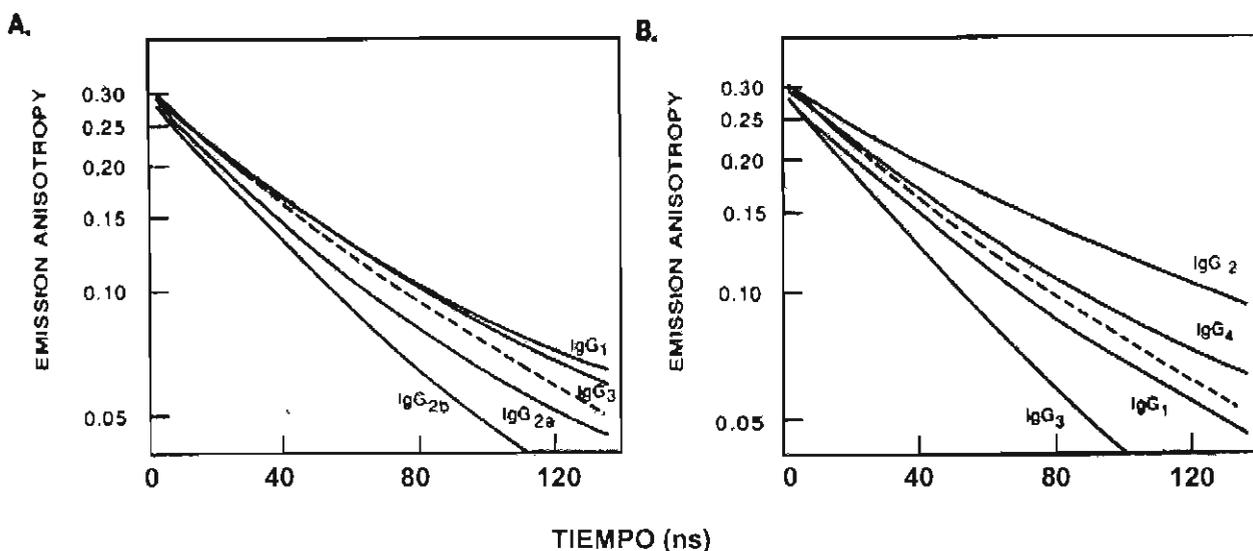


Fig 2. Flexibilidad segmental de isotipos quiméricos de IgG. Cinética de anisotropía de emisión de ϵ -dansil-L-lisina unido a diferentes isotipos de IgG quiméricos de ratón (A) y humano (B); los datos de la IgG de conejo se muestran con una línea punteada en cada uno de los gráficos, para facilitar la comparación (Dangl *et al.*, 1988).

La mayor velocidad de decaimiento de anisotropía de la IgG2b indica que es la IgG murina más flexible, mientras que la IgG1 es la más rígida; la IgG3 es la IgG humana más flexible, mientras que la IgG2 es la más rígida. En ambas comparaciones la IgG de conejo se ubica en un punto intermedio.

Tabla 3. Tiempos promedio de correlación rotacional (en ns) y la fijación de complemento en relación con la longitud de la región superior de la bisagra

Isotipo	Secuencia de la bisagra				Longitud de la región alta de la bisagra	$\langle \phi \rangle^d$	Fijación de complemento ^e		
	Alta	Media	Inferior				Humano	Conejo	Puerco de Guinea
	216			238					
IgG3 r ^a	EPRIPKPSTPPGSS	C	P	PGNILGGP	14	78 ± 3ns	70	15	-
IgG3 H ^b	ELKTPLGDTTHT	CORCP(EPKSCDTPPPCPRCP) ₃		APELLGGP	12	50 ± 2ns	100	30	100
IgG2b r	EPSPGPISTINP	CPPCKECKHK	CP	APNLEGGP	11	55 ± 2ns	80	30	200
IgG1 H	EPKSCDKTHT	CPP	CP	APELLGGP	10	69 ± 3ns	300	80	300
IgG2a r	EPRGPTIKP	CPPCK	CP	APNLLGGP	9	63 ± 2ns	250	25	250
IgG c ^c	APSTCSKPT	C	P	PPELLGGP	9	72 ± 3ns	300	400	450
IgG4 H	ESKYGPP	CPS	CP	APEFLGGP	7	84 ± 3ns	-	-	-
IgG1 r	VPRDCG	CKPCI	CT	VPSEVS	6	81 ± 3ns	+/-	+/-	+/-
IgG2 H	ERK	CCVECPP	CP	APPVAG	3	120 ± 5ns	-	250	-

a. Ig de ratón; b. Ig humana; c. Ig de conejo; d. $\langle \phi \rangle$ es el tiempo promedio de correlación rotacional en ns; e. Los valores representan la cantidad de antígeno requerido (DNS₂₆-BSA) en ng; para la lisis del 50 % de eritrocitos iniciales, por 10 µg de anticuerpo. Los ensayos de fijación de complemento se realizaron empleando como fuentes de los componentes del complemento sueros de humano, de conejo y de puerco de Guinea. Se incubaron los diferentes isotipos a probar con eritrocitos sensibilizados con DNS₂₆-BSA (Complejo de albúmina sérica bovina-dansyl, marcado con cromo radioactivo, ⁵¹Cr), 25 µL de complemento y 10 µL de anticuerpo. Por centelleo se determinó la cantidad de eritrocitos intactos.

Código de aminoácidos: A = alanina, C = cisteína, D = ác. aspártico, E = ác. Glutámico, F = fenilalanina, G = glicina, H = histidina, I = isoleucina, K = lisina, L = leucina, P = prolina, R = arginina, S = serina, T = treonina, V = valina, Y = tirosina

□ Los sombreados son los que utilizamos en el desarrollo de este proyecto (IgG1, IgG2b de ratón e IgG de conejo). (Modificado de Dangi *et al.*, 1988).

Se sabe que la unión entre el receptor (FcγR) y el Fc de la inmunoglobulina induce cambios conformacionales en la región de la bisagra inferior y es muy posible que la flexibilidad de la región de la bisagra los facilite (Kato, 2000), por ello la estructura de la IgG que agregue a los receptores puede ser determinante para las diferencias en sus capacidades para activar respuestas efectoras.

3. Receptores para Fc

Los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas unen la respuesta inmune humoral a la celular (Van Vugt y Van Winkel, 2001), ya que cuando los FcR se unen al anticuerpo, que a su vez está unido por la porción Fab al antígeno, proveen a la célula especificidad celular que algunas de ellas carecen para montar específicamente los mecanismos efectores que conducirán a la eliminación del antígeno.

Pueden distinguirse dos tipos generales de FcR: los que son expresados por leucocitos, que son específicos para cada tipo de inmunoglobulina y que activan funciones efectoras; y los que median el transporte de inmunoglobulinas a través de los epitelios o superficies endoteliales (Van Vugt y Van Winkel, 2001). En este trabajo sólo nos referimos a los primeros.

Dentro de la familia de FcRs que median funciones efectoras los mejor caracterizados son los FcεRI y los FcγR. Algunos de estos inmunoreceptores para IgG contienen motivos de activación basados en tirosina (ITAMs). Los ITAMs son secuencias de aminoácidos esenciales en la activación de funciones biológicas, compuestos de un par de secuencias repetidas de YXXL, separadas por siete residuos variables (Daeron, 1997). Otros FcRs contienen motivos de regulación negativa, ya que en su región citoplásmica tienen motivos de inhibición basados en tirosina (ITIM), compuestos por una secuencia de seis aminoácidos, IXYXXL. En general el entrecruzamiento de estos receptores inicia diferentes funciones biológicas, de activación o de inhibición dependiendo del tipo de receptor entrecruzado (Van Vugt y Van Winkel, 2001, Abbas, *et al.*, 2003) y de la célula en cuestión.

Existen FcR para todas las clases de anticuerpos: FcγR, para IgG, FcμR, para IgM, FcαR, para IgA, FcδR para IgD y FcεR para IgE. Estas moléculas se pueden encontrar tanto como receptores de membrana o como moléculas solubles, producidos por splicing alternativo o por proteólisis de receptores de membrana (Daëron, 1997). Los receptores para la porción Fc de la IgG, IgA e IgE (el FcεRI, por que el FcεRII es miembro de la familia de las lectinas), son miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (Daëron, 1997; Van Vugt y Van Winkel, 2001).

Para llevar las señales al interior de las células se requiere que los FcRs se agreguen a través del reconocimiento de un antígeno multivalente recubierto de anticuerpos. La agregación puede ocurrir bajo dos condiciones dependiendo de la afinidad del receptor, los de alta afinidad, por ejemplo los FcεRI en células cebadas, con valores de constantes de afinidad de 10^9 - $10^{10} M^{-1}$ el FcγRI en macrófagos, también con $K_a = 10^9$ - $10^{10} M^{-1}$, $K_a = 5 \times 10^7$ para FcαR en monocitos. Estos receptores son tan afines que pueden unir inmunoglobulinas monoméricas, sin que se

encuentren formando parte de complejos inmunes; y los de baja afinidad que no unen inmunoglobulinas monoméricas ($K_a < 10^7 \text{ M}^{-1}$, como Fc γ RII y III, Fc ϵ RII) cuya unión a las inmunoglobulinas no es detectable a menos que se una a complejos inmunes o antígenos opsonizados (Daëron, 1997).

El evento intracelular que sigue a la agregación de receptores activadores es la fosforilación de los ITAMs, lo que permite la asociación y activación de varias proteínas cinasas de tirosina, primero las de la familia Src, luego la cinasa Syk. Esta última fosforila varios sustratos intracelulares, que incluyen enzimas como fosfolipocinasas, fosfolipasas y moléculas adaptadoras, así como proteínas asociadas al citoesqueleto (Daëron, 1997).

La respuesta biológica parece depender del tipo celular más que del receptor, aunque la agregación de FcRs con ITAMs induce dos tipos de respuestas: la internalización y la activación (Daëron, 1997). *In vitro*, las células cebadas degranulan si se les estimula con complejos inmunes de IgG, las NKs activan la ADCC para eliminar blancos cubiertos con IgG, a través de Fc γ RIII, que es el único FcR que tiene este tipo celular. El Fc γ RI media esta misma actividad en macrófagos y monocitos, activa la producción de superóxido y la secreción de citocinas inflamatorias, mediante la inducción de la producción de NF- κ B. El Fc γ RIIA activa el estallido respiratorio en neutrófilos. En cuanto a los fenómenos de internalización se sabe que Fc γ RI y Fc γ RIIA así como Fc α RI y Fc ϵ RI median tanto endocitosis de complejos inmunes solubles como la fagocitosis de partículas recubiertas de inmunoglobulinas (Daëron, 1997).

3.1. Receptores para inmunoglobulinas G

Los Fc γ R están formados por las subunidades FcR α y FcR γ , exceptuando al Fc γ RII, que no tiene cadena γ y que en su cadena α contiene al ITAM (Fc γ RIIa) o ITIM (Fc γ RIIb). La subunidad FcR α es una molécula transmembranal que tiene dos o tres dominios extracelulares de inmunoglobulina de tipo variable y es la encargada de unir al ligando. La cadena FcR γ es una molécula transmembranal con una porción citoplásmica donde se localiza el ITAM. La cadena FcR α y un dímero de cadenas FcR γ se asocian a través de interacciones no covalentes (**figura 4**).

Distintos tipos celulares expresan Fc γ Rs, como linfocitos T y B, monocitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos, células cebadas y células NKs (Daëron, 1997).

El Fc γ RI es un receptor de alta afinidad para IgG, mientras que los Fc γ RII y Fc γ RIII se conocen como receptores de baja afinidad, y el recién descrito Fc γ RIV de afinidad intermedia.

Además de los Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, de los que ya en los párrafos anteriores describimos las actividades biológicas, expresión celular y afinidad por sus ligandos; recientemente se ha descrito el receptor Fc γ RIV.

El Fc γ RIV es un receptor, también llamado FcRL3 o CD16-2, ya que muestra un 63 % de homología con el Fc γ RIII (CD16) humano. Existe evidencia de que requiere de la asociación de la cadena γ para expresarse en la superficie celular. La expresión de este receptor ha sido detectada en células del linaje mieloide (como monocitos de sangre periférica, células dendríticas de bazo y médula ósea, neutrófilos y macrófagos reclutados por tioglicolato) pero no ha sido detectada en poblaciones linfoides (ni en células T, ni B, ni en NKs) ni en otros granulocitos (Nimmerjahn F *et al.*, 2005).

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

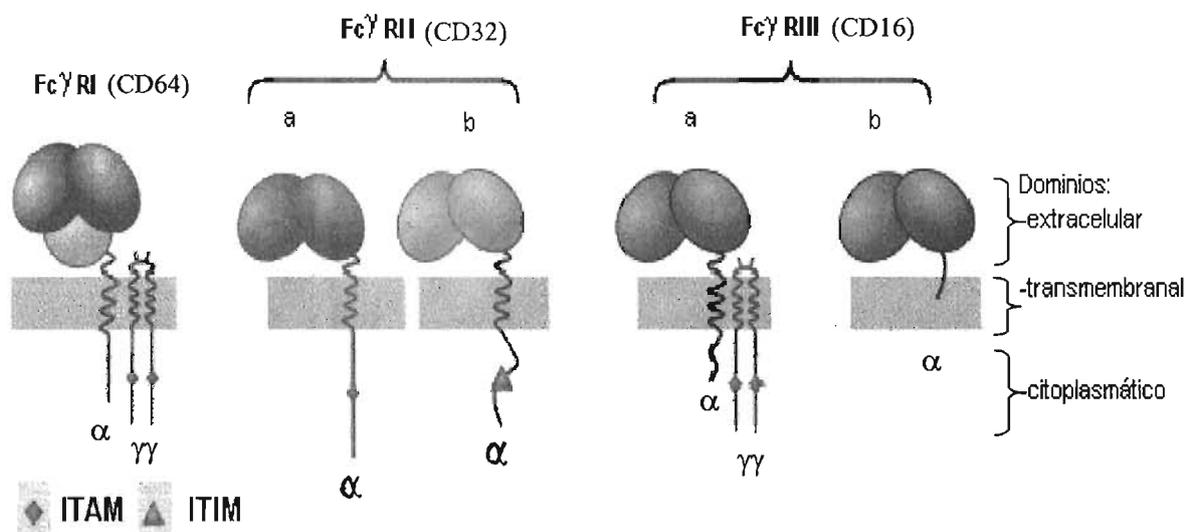


FIG 4. Estructura de los receptores para IgG. Las tirosinas del ITAM contenidas en el tallo citoplasmático están indicadas en rombos rojos, los ITIM en triángulos verdes. Se representan dos o tres dominios de unión al ligando en óvalos. Todos tienen un dominio transmembranal y un tallo citoplasmático con excepción del Fc γ RIIIb el cual está unido a la membrana por glicofosfatidilinositol. El Fc γ RIIIa puede estar formado de la asociación de la cadena α y dos cadenas γ , la cadena α y dos cadenas ζ (que a diferencia de las cadenas γ tiene tres ITAMs) o la cadena α y un heterodímero $\gamma\zeta$ (aquí se representa α asociada con un dímero de ζ) (Modificado de Hogarth PM, 2002).

3.2. Sitios de unión de los anticuerpos a los Fc γ R

Los estudios realizados con anticuerpos monoclonales contra epítopes de IgG se han usado para determinar la capacidad de estos anticuerpos de inhibir la unión de IgG marcada radioactivamente a células U937. La capacidad de los monoclonales de interactuar con su respectivo epítipo en la IgG unida al FcR se veía afectada dependiendo de los epítipes que reconocía el anticuerpo. Se determinó así que un posible sitio de unión involucraba la región baja de la bisagra de la IgG, los residuos Leu 234-Ser 239 con una posible interacción además de dos regiones de β plegadas hacia al amino terminal (Gly 316-Lys 338) (Burdon *et al.*, 1988). Se han identificado algunos sitios involucrados en la interacción de la IgG humana con los receptores Fc γ RI y Fc γ RII utilizando análisis mutacionales (Lund, 1991). La región de la bisagra inferior junto con el dominio C $_H$ 2 parecen ser los sitios de unión de la IgG con Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII; la secuencia Leu-Leu-Gly-Gly en las posiciones 234-237 es el motivo óptimo para esta interacciones. Esta secuencia está presente en las subclases IgG1 e IgG3 humanas, y en las IgG2a e IgG2b murinas (Lund, 1991; Sarmay, 1992). Tres mutantes de IgG (Gly 237 \rightarrow Ala, Asn 297 \rightarrow Ala y Glu 318 \rightarrow Ala) no se unen al Fc γ RII, ni en forma de complejo ni en forma monomérica. Una molécula alterada de oligosacárido unido al C $_H$ 2 afecta la capacidad de la IgG para reaccionar con los Fc γ R, probablemente por la influencia de la estructura local en el sitio de unión (Jefferis, 1997).

Aunque los reportes anteriores indican una clara participación de la región baja de la bisagra, existen también reportes que indican que la unión es más bien a través de un sitio que comprende residuos entre los dominios C $_H$ 2 y C $_H$ 3 (Greenwood, 1993).

En la experimentación con células que contienen Fc γ R, puede inhibirse la unión de complejos inmunes a los receptores con proteína A, la cual se ha determinado por cristalografía que se une a los anticuerpos en una región entre los dominios C $_H$ 2 y C $_H$ 3 (Ades, 1976; Deisenhofer, 1981), lo cual sugiere que la proteína A y los Fc γ Rs comparten al menos parcialmente el sitio de unión al anticuerpo.

Capítulo 3

HIPÓTESIS

El isotipo de IgG que agregue a los receptores influye cualitativa y/o cuantitativamente en la producción de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α .

OBJETIVO GENERAL

Definir si el isotipo de IgG que opsoniza a una partícula influye en la producción y secreción de citocinas proinflamatorias: IL-1 β , IL-6 y TNF- α , en macrófagos murinos de las líneas celulares J774, P388, así como en macrófagos derivados de médula ósea de ratón BALB/c.

Objetivos particulares

- Estandarizar el aislamiento de células de médula ósea de ratón y la diferenciación de precursores de monocitos a macrófagos.
- Estandarizar el ensayo de estimulación a través de Fc γ Rs en macrófagos de ratón de la línea celular J774 y macrófagos derivados de médula ósea, para la detección de IL-6 e IL-1 β en sobrenadantes.
- Estandarizar el ensayo de estimulación a través de Fc γ Rs en macrófagos de ratón de las líneas celulares J774 y P388 para la detección intracelular de IL-6 y TNF- α por citometría de flujo.
- Determinar si el isotipo IgG1 comparado con el IgG2b induce diferencias cuantitativas en la producción de citocinas IL-6, IL-1 β y TNF- α producidas en respuesta a la agregación de los Fc γ R por los macrófagos murinos de las líneas celulares J774 y P388, así como en macrófagos derivados de médula ósea.

Capítulo 4

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular. Se cultivaron macrófagos murinos de las líneas celulares J774 y P388, obtenidas del ATCC. Se aislaron promonocitos de médula ósea de ratón para diferenciarlos a macrófagos, para lo que además se cultivaron fibroblastos de la línea celular L-929 del cual se recolectaron los sobrenadantes para complementar el medio de médula ósea necesario para la diferenciación de promonocitos a macrófagos. Se empleó medio D-MEM (Gibco BRL, Grand Island, NY) para las células J774, L-929 y macrófagos derivados de médula ósea y RPMI (Gibco BRL, Grand Island, NY) para las células P388. Ambos medios se prepararon según las instrucciones del fabricante (GIBCO BRL, 1992) (ver anexo II).

Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C.

Sensibilización de eritrocitos de carnero con 2,4,6-trinitrofenol (TNP). Para estudiar la fagocitosis mediada por los FcγR, se utilizó un sistema 2,4- dinitrofenol(DNP)/ anticuerpos antiDNP. Las células fagocitaron eritrocitos de carnero recubiertos de TNP que estaban opsonizados por IgG que reconocen al hapteno DNP (el anticuerpo monoclonal 2C5 pertenece a la subclase IgG1 y el anticuerpo monoclonal 4F8 a la subclase IgG2b. Ambos son anticuerpos anti-DNP y presentan reactividad cruzada para TNP. También se utilizaron anticuerpos IgGs policlonales producidos en conejo con la misma especificidad).

Los eritrocitos se sensibilizaron con 2,4,6,-trinitrofenol (TNP, Eastman Kodak CO. Rochester, NY). Para marcar las proteínas de membrana de los eritrocitos con el hapteno TNP, se hacen reaccionar los grupos amino libres de las proteínas con el ácido 2, 4, 6-trinitrobencensulfónico en condiciones ligeramente alcalinas. Después de la reacción se libera un grupo sulfónico quedando el hapteno TNP unido covalentemente a las proteínas de la membrana del eritrocito (**Fig. 4**). El procedimiento es el siguiente:

- Se toman 10 ml de eritrocitos de carnero en solución de Alsevers (ver anexo).
- Se lavan por centrifugación con la solución amortiguadora de DGVB²⁺ (ver anexo), para eliminar los restos de eritrocitos lisados.
- Se lava el paquete celular con solución amortiguadora de boratos (ver anexo) y DGVB²⁺ en la misma proporción (V/V), y se elimina el sobrenadante.

- Se adicionan 7 ml de la solución para sensibilizar (6.22 mg TNBS/ 7 ml solución amortiguadora de boratos, estéril, filtrada con membrana de 0.2 μm), por cada mililitro de paquete celular.
- La suspensión de eritrocitos se cubre de la luz y se incuba por 10 minutos a temperatura ambiente en agitación constante.
- Se lava el paquete celular con solución amortiguadora de boratos y se elimina el sobrenadante. El paquete celular se lava nuevamente con amortiguador de DGVB²⁺ para eliminar completamente el TNBS restante y los eritrocitos lisados.
- Se mantienen a 4 °C en amortiguador de DGVB²⁺ cubiertos de la luz. A esta temperatura se pueden mantener hasta por una semana.

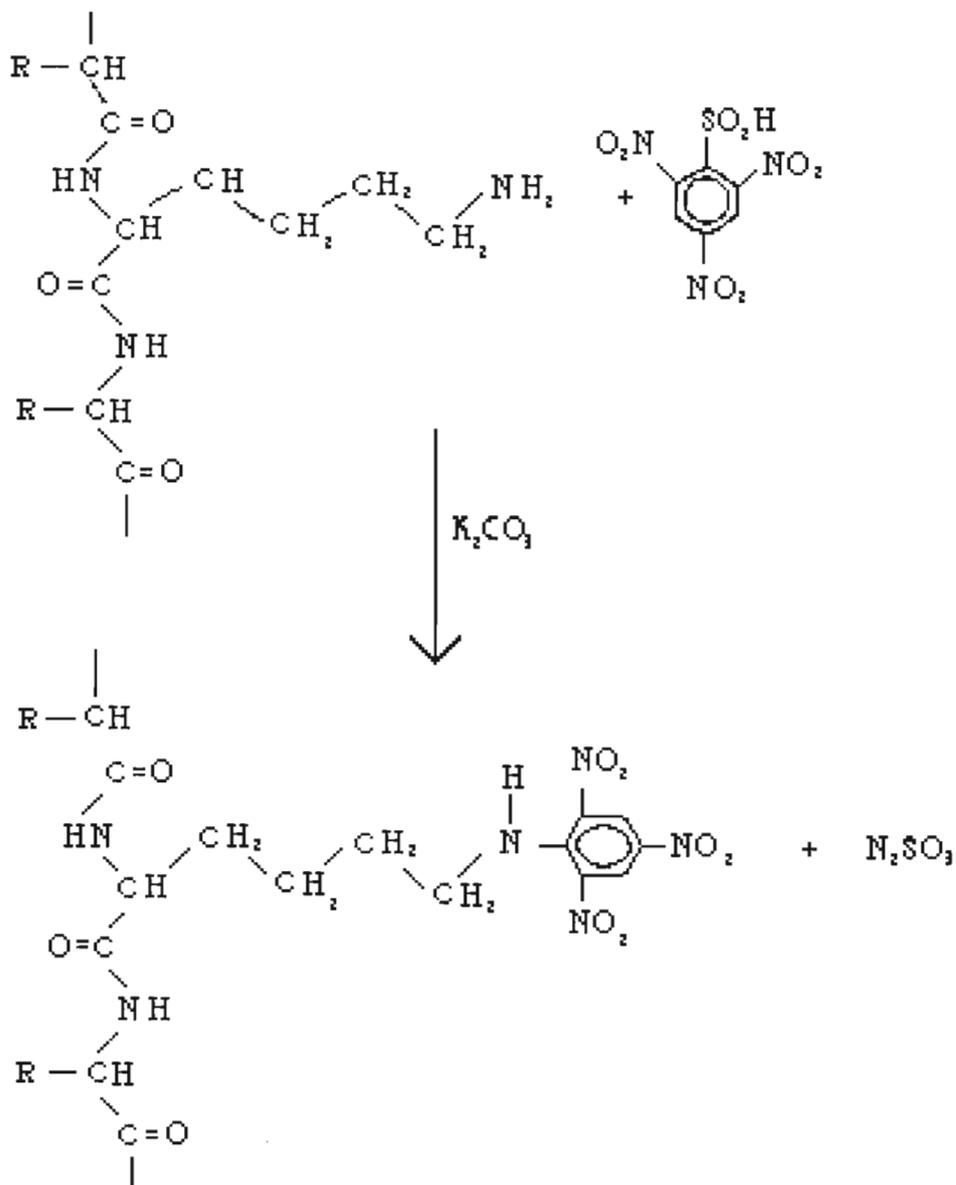


Fig 4. Reacción de trinitrofenilación de proteínas. El ácido 2, 4, 6- trinitrobencensulfónico reacciona con el grupo ϵ -amino de los residuos de lisina de la proteína, liberándose ácido sulfónico, y quedando unido a las proteínas el grupo trinitrofenol (TNP) (Eisen, 1966).

Titulación de los anticuerpos anti-DNP (Hemaglutinación). El método de hemaglutinación consiste en hacer diluciones seriadas de la solución conteniendo al anticuerpo, en pozos de fondo en V para microtitulación y luego agregar en cada pozo glóbulos rojos sensibilizados para determinar la dilución máxima a la cual todavía hay aglutinación visible. El procedimiento a seguir es el siguiente:

- Se realizan diluciones seriadas (1:2) de la solución de anticuerpos en DGVB²⁺ o en D-MEM sin complementar en un volumen final de 100 μ L/pozo. La concentración inicial de los anticuerpos es de 10 μ g/ml en el primer pozo.
- Se agrega un volumen igual al de la dilución del anticuerpo, de la suspensión al 2% de eritrocitos sensibilizados. Se mezcla agitando la placa cuidadosamente.
- Se incuba a temperatura ambiente por 1 hora en una cámara húmeda.

La aglutinación de los eritrocitos sensibilizados indica la presencia de una concentración de anticuerpo lo suficientemente alta para permitir la formación de una malla uniforme en el fondo del pozo. Cuando la concentración es menor se formará un botón en el centro del fondo del pozo. El título de hemaglutinación corresponde a la última dilución en la que aún se forma la malla.

Opsonización de eritrocitos sensibilizados con TNP. El procedimiento es el siguiente:

- Se lavan los eritrocitos sensibilizados en medio D-MEM sin complementar, se centrifugan y se suspenden al 2% en D-MEM.
- Se diluye el anticuerpo en D-MEM sin complementar, a una dilución menor a la concentración hemaglutinante.
- Se mezcla la dilución del anticuerpo con los eritrocitos sensibilizados, obteniendo una suspensión al 1% de eritrocitos y se incuban en agitación constante a temperatura ambiente por 30 minutos.
- Se lavan (1 vez) y resuspenden con D-MEM sin complementar, para obtener una suspensión al 1 % de eritrocitos opsonizados.

Cuantificación de fagocitosis de eritrocitos por la técnica de diaminobencidina. Para cuantificar la fagocitosis se empleó un microensayo colorimétrico estandarizado en nuestro laboratorio. Este microensayo está basado en el método de Jungi (Jungi, 1985), que se fundamenta en la actividad de pseudoperoxidasa que posee la hemoglobina, la cual desarrolla un compuesto colorido en presencia de 3,3-diaminobencidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO) y

peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Merck, Darmstadt, Alemania). Esta reacción colorida puede ser cuantificada espectrofotométricamente. El procedimiento a seguir es el siguiente:

- Se siembran 6.5×10^4 macrófagos por pozo en una placa de cultivo de 96 pozos en D-MEM complementado. Se incuban en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 a $37^\circ C$ por 24 horas. Pasado este tiempo las células han formado una monocapa en el fondo del pozo.
- A cada pozo se agregan 25 μl de la suspensión al 1% de eritrocitos opsonizados, como se describió en los párrafos anteriores, y se incuban durante 45 minutos a $37^\circ C$, con 5 % de CO_2 .
- Para eliminar los eritrocitos que no fueron internalizados durante el periodo de incubación, las células se lavan con agua destilada por 10 segundos en agitación suave, para lizarlos por un choque hipotónico. Después se realizan tres lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS, ver anexo) para eliminar la hemoglobina que estuviera fuera de las células.
- Las células se lisan con 100 μl /pozo con una solución de detergente SDS (Bio-Rad, Richmond, CA) al 0.3% en PBS.
- Las placas se incuban a temperatura ambiente en agitación constante hasta que al microscopio ya no se observan células íntegras (3 min aprox.). Pasado ese tiempo se adicionan 200 μl /pozo del sustrato DAB (8 mg de DAB, 240 μl de H_2O_2 en 20 ml de PBS para 1 placa).
- Las placas se incuban a temperatura ambiente en agitación constante hasta desarrollo de color.
- Se determina la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems, modelo 354).

En los experimentos individuales, cada condición experimental se realizó por triplicado y los datos de cada experimento se manejaron como la media +/- la desviación estándar.

Obtención de monocitos de médula ósea de ratón y su diferenciación a macrófagos. Con el objetivo de tener otro sistema en donde ensayar la estimulación a través de $Fc\gamma R_s$, pensamos en células de médula ósea de ratón y derivarlas a macrófagos. El procedimiento utilizado para obtener macrófagos derivados de médula ósea (Mf dMO) fue el siguiente:

- Ratones de la cepa BALB/c hembras de entre 6-8 semanas de edad, se sacrifican por dislocación cervical y se fijan a una plantilla para ratón.

- Se extraen ambos fémures y se colocan en un tubo con PBS, pH 7.4.
- En la campana de seguridad biológica se lavan los fémures con alcohol al 70% (10 seg) y posteriormente 3 veces con PBS pH=7.4, estéril. Se colocan en una caja Petri.
- Se cortan los extremos del fémur dejando un canal para hacer eluir la médula ósea, empleando 2.5 mL de D-MEM complementado con 10 % SFB, eluyendo por ambos extremos del fémur.
- Se colecta el eluido en tubos estériles cónicos de 15 mL y se centrifuga a 1100 rpm/2 min/ 4°C.
- El botón se resuspende en 6 mL de medio de médula ósea (ver anexo).
- Se siembra 1 mL de la suspensión celular en cajas petri de cultivo celular de baja adherencia y se completa el volumen a 20 mL con medio de médula ósea.
- Al tercer día se agregan 5 mL de medio de médula ósea y se continúa con la incubación a 37 °C, con 5% de CO₂ durante tres días más.
- Al sexto día se desecha el medio de las cajas y se lavan 2 veces con 10 mL de PBS (pH 7.4) frío. Se dejan en hielo con 10 mL de PBS pH 7.4 para que se despeguen las células y así poder contarlas y sembrarlas a la concentración requerida.

Estimulación de macrófagos murinos a través de los FcγR con eritrocitos opsonizados con IgG.

Se despegan las células (ya sea la línea celular J774 o los macrófagos derivados de médula ósea) y se recuperan colectando los sobrenadantes y centrifugando a 1100 r.p.m. por 3 minutos a 4°C. Se siembran 6.5×10^4 células por cada 100 μL de medio complementado con el medio correspondiente por pozo, en placas de 96 pozos, si son de las líneas celulares, y 1×10^5 células por cada 100 μL de D-MEM complementado por pozo, en placas de 96 pozos si son macrófagos derivados de médula ósea de ratón. Después de mantener a las células por 24 horas en medio complementado en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C, se estimulan las células utilizando eritrocitos opsonizados. En nuestro trabajo el procedimiento empleado fue el siguiente:

Para cada condición experimental se utilizaron 1×10^5 células/100 μL de medio DMEM complementado al que se adicionó un inhibidor de proteasas (ver anexo) por pozo y se incubaron con una suspensión de eritrocitos sensibilizados u opsonizados (relación de 25 μl de suspensión de eritrocitos al 1% por cada 1×10^5 células) y se mantuvieron en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C, hasta la recolección de sobrenadantes (no se retira el estímulo).

Se estimuló con una suspensión al 1% de eritocitos opsonizados con IgG1 (2C5), IgG2b (4F8), con ambos (IgG1/IgG2b) y con IgG policlonal de conejo todos anti DNP.

Como control positivo de estimulación se utilizó LPS (*E.coli* serotipo 0111:B4, Sigma Chemical Co.)

Recolección de sobrenadantes. Se recolectaron sobrenadantes a las 24, 48 y 72 horas de estimulación, en tubos eppendorf estériles y se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su análisis por ELISA.

ELISA para la determinación de IL-6 e IL-1 β

Sensibilización de la placa

- En una placa para ELISA (Corning 3590, NY) se ponen 100 μL /pozo de anticuerpo de captura (según la dilución requerida, en PBS). Se incuba toda la noche a temperatura ambiente.
- Se hacen 3 lavados con 300 μL /pozo con amortiguador de lavado (ver anexo IV). Eliminar el exceso de amortiguador.
- Se adicionan 300 μL /pozo de solución de bloqueo.
- Se Incuba 1 h a temperatura ambiente.
- Se hacen 3 lavados con 300 μL /pozo con amortiguador de lavado. Eliminar el exceso de amortiguador.

Ensayo

- Se agrega a cada pozo la muestra o estándar en la dilución correspondiente (diluir en PBS-BSA 1%), se mezcla suavemente. Se cubre la placa con una mica adherible y se incuba 2 h a temperatura ambiente.
- Se hacen 3 lavados con 300 μL /pozo con amortiguador de lavado. Eliminar el exceso de amortiguador.
- Se agregan 100 μL /pozo de anticuerpo de detección (biotinilado) a la dilución requerida (diluir en PBS-BSA 1%). Se cubre la placa con una mica adherible y se incuba 2 h a temperatura ambiente.
- Se hacen 3 lavados con 300 μL /pozo con amortiguador de lavado. Eliminar el exceso de amortiguador.
- Se agregan 100 μL /pozo de estreptavidina-peroxidasa a una dilución de 1:4000 (diluir en PBS-BSA 1%, la dilución se prepara justo antes de usarla), se cubre con una mica adherible y se incuba durante 20 min a temperatura ambiente.

- Se hacen 3 lavados con 300 μ L/pozo con amortiguador de lavado. Eliminar el exceso de amortiguador.
- Se agregan 100 μ L/pozo de solución de ABTS lista para usarse (ZYMED). Se incuba cubierto de la luz directa y a temperatura ambiente, de 20 a 30 min para desarrollo de color.
- Se determina la densidad óptica a 405 nm, en un lector para placas de ELISA.

TINCIÓN INTRACELULAR PARA CITOCINAS IL-6 y TNF- α

Empleando el juego de BD Biosciences para la detección de citocinas intracelulares, BD Cytotfix/Cytoperm Plus™ Kit (con GolgiStop™) –ver anexo V-; se llevó a cabo la tinción intracelular de IL-6 y TNF- α en macrófagos estimulados con eritrocitos opsonizados con distintos isotipos de IgG de ratón (2C5, 4F8, ambos) y un policlonal de conejo, todos anti-DNP, de las líneas celulares P388 y J774. Como control positivo de estimulación se empleó LPS (*E. coli* 0111:B4 de SIGMA chemical Co).

A. Estimulación de macrófagos murinos a través de los Fc γ R con eritrocitos opsonizados con IgG para tinción de citocinas intracelulares.

Se despegan las células (ya sea las líneas celulares o los macrófagos derivados de médula ósea) y se recuperan tomando el sobrenadante y centrifugando a 1200 r.p.m. por 3 minutos a 4°C. Se siembran 2.5×10^5 células/250 μ L de medio complementado en tubos eppendorf con tapón de rosca estériles de 1 mL. Se adicionan 100 μ L del estímulo correspondiente en una suspensión al 1% preparada en medio sin complementar, y LPS a 1 μ g/mL (diluido en D-MEM sin complementar) como concentración final para control positivo de estimulación. Se incuba en una atmósfera húmeda con 6% de CO₂ a 37°C, con los tapones entreabiertos.

Pasada 1 h se centrifugan las células y se resuspenden en 300 μ L de solución BD GolgiStop (monensina, Kit Cytotfix/Citoperm, BD Biosciences, Cat. 554715) diluido en medio complementado (4 μ L de BD GolgiStop/6mL de medio). Se vuelve a adicionar la cantidad suficiente para que la concentración de LPS vuelva a ser 1 μ g/mL. Se pone a incubar nuevamente en las mismas condiciones por 5 horas más.

Al término de las 5 horas se centrifuga a 1100 rpm 3 min para recolectar las células. Se colocan las células en tubos para leer en el citómetro de flujo. Se lavan con amortiguador de tinción (ver anexo V).

Para fijarlas y poderlas teñir al siguiente día se centrifugan a 1100 rpm, 3 min a 4 °C y se resuspenden en 100 µL de una solución de fijadora (ver anexo V) y se incuban 20 min en un baño de hielo.

Las células se lavan dos veces con 500 µL de amortiguador de tinción y se guardan a 4 °C para su tinción a la mañana siguiente.

B. Tinción intracelular para IL-6 y TNF- α

- Resuspender las células en 500 µL de BD Perm/Wash 1x (Kit Cytotfix/Citoperm, BD Biosciences, Cat. 554715, ver anexo) e incubar por 15 min en un baño de hielo.
- Centrifugar a 1100 rpm, 3 min, 4 °C.
- Resuspender cada muestra en un volumen de 50 µL de BD Perm/Wash 1x que contenga la concentración requerida de anticuerpo anti-citocina conjugado. Para la detección en la misma muestra de IL-6 y TNF- α , el anti-IL6 está marcado con ficoeritrina y anti-TNF- α con isotiocianato de fluoresceína, se usaron a ≤ 0.25 µg/mL y ≤ 0.5 µg/mL /1 x 10⁶ células, respectivamente (para la información completa acerca de estos anticuerpos y el juego completo ver el anexo VI y V, respectivamente).
- Se prepararon los controles de isotipo utilizando 2C5 marcado con isotiocianato de fluoresceína y un anti-HLA marcado con ficoeritrina, ambos preparados en ratón, y utilizando las mismas concentraciones que las usadas para los anticuerpos anti-citocinas.
- Se incuban los tubos por 30 minutos en baño de hielo protegidos de la luz.
- Se lavan dos veces con amortiguador BD Perm/Wash.
- Finalmente se resuspenden en 500 µL de amortiguador para tinción y se leyeron en el citómetro de flujo FACScan (BECTON DICKINSON) .

Capítulo 5

RESULTADOS

Influencia del isotipo de IgG en la fagocitosis mediada por anticuerpos

Con el objetivo de verificar que hay una estimulación de los macrófagos a través de los Fc γ Rs al interaccionar con eritrocitos opsonizados con los distintos isotipos de IgG, cuantificamos la fagocitosis de glóbulos rojos de carnero opsonizados con diferentes isotipos de IgG. Empleando células J774, los resultados indican que cuando la partícula está recubierta con IgG2b es más eficientemente internalizada que cuando está recubierta con IgG1, pero la fagocitosis es aún mejor si se recubre al eritrocito con IgG de conejo, como ya se había reportado en este laboratorio (**figuras 5 y 8 A-F**).

Para las células P388 (**figuras 6 y 9 A-F**), aunque la capacidad fagocítica es mucho menor a la que presentan las células J774, el comportamiento es el mismo: la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG2b es mayor que cuando los eritrocitos están opsonizados con IgG1, aún cuando las cantidades de eritrocitos ingeridos por célula sean menores en todos los casos.

La capacidad fagocítica de los Mf dMO es muy alta, aún más alta que las de las células J774, pero en estas células las partículas opsonizadas con IgG1 son fagocitadas más eficientemente que las opsonizadas con IgG2b. Al igual que en las líneas celulares J774 y P388, la fagocitosis de glóbulos rojos recubiertos con IgG de conejo es la más abundante (**figura 7 y 10 A-G**). La capacidad fagocítica de los Mf dMO es tan alta que por microscopía no son detectables las diferencias en la cantidad de eritrocitos internalizados (**figura 10 A-G**). Sin embargo la cuantificación por medio de la oxidación de diaminobencidina revela que si existen diferencias respecto al isotipo de IgG opsonizante (**figura 7**).

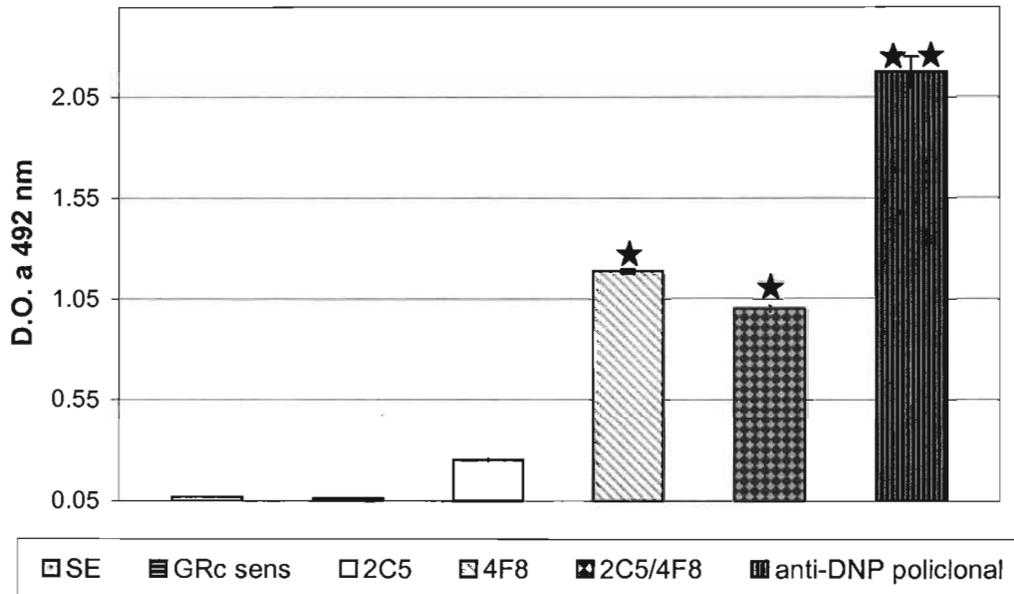


Figura 5. Fagocitosis de glóbulos rojos de carnero opsonizados con IgG1(2C5), IgG2b (4F8), con IgG1 e IgG2b (2C5/4F8) y con anticuerpos policlonales, todos anti-DNP, con macrófagos de la línea celular J774, SE: sin estimular. La fagocitosis se cuantificó a través de la oxidación de diaminobencidina, leída a 492 nm, a los 45 min de estimulación. Las estrellas indican diferencia significativa en la densidad óptica a 492 nm con respecto al control, y doble si la diferencia es con respecto a los isotipos empleados, determinado a través de la prueba de Duncan con $P < 0.05$.

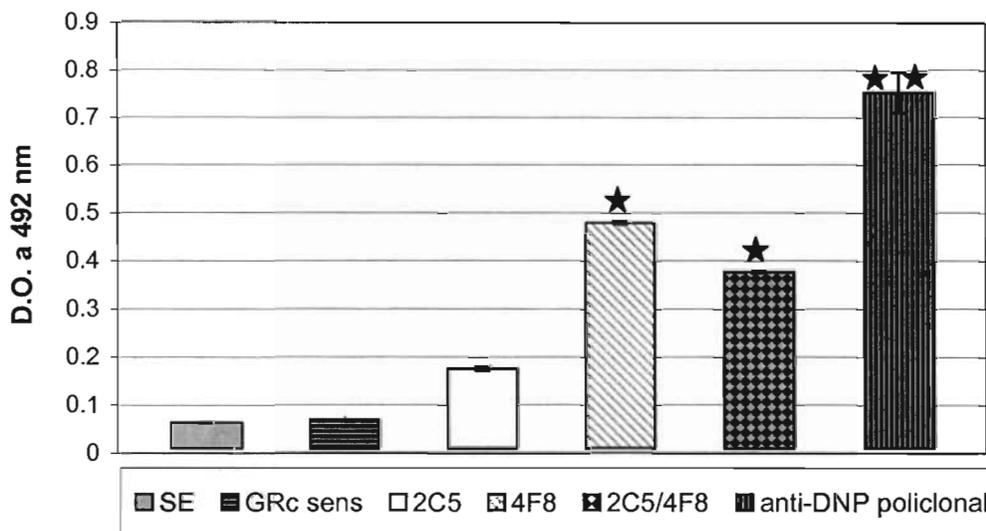


Figura 6. Fagocitosis de glóbulos rojos de carnero opsonizados con IgG1(2C5), IgG2b (4F8), con IgG1 e IgG2b (2C5/4F8) y con anticuerpos policlonales, todos anti-DNP, en macrófagos de la línea celular P388. SE: sin estimular. La fagocitosis se cuantificó a través de la oxidación de diaminobencidina, leída a 492 nm, a los 45 min de estimulación. Las estrellas indican diferencia significativa en la densidad óptica a 492 nm con respecto al control, y doble si la diferencia es con respecto a los isotipos empleados, determinado a través de la prueba de Duncan con $P < 0.05$.

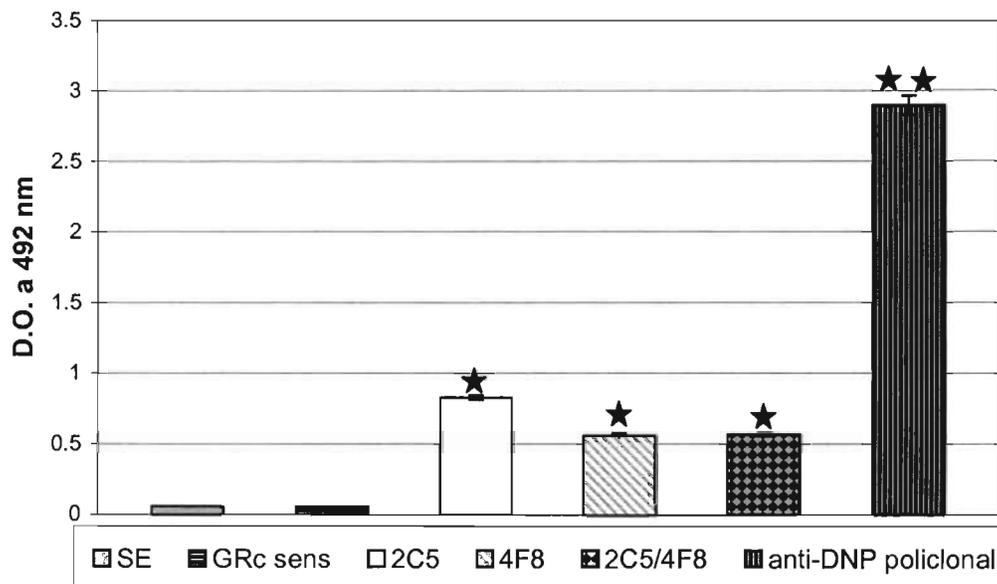


Figura 7. Fagocitosis de glóbulos rojos de carnero opsonizados con IgG1(2C5), IgG2b (4F8), con IgG1 e IgG2b (2C5/4F8) y con anticuerpos policlonales, todos anti-DNP, en macrófagos derivados de médula ósea. SE: sin estimular. La fagocitosis se cuantificó a través de la oxidación de diaminobencidina, leída a 492 nm, a los 45 min de estimulación. Las estrellas indican diferencia significativa en la densidad óptica a 492 nm con respecto al control, y doble si la diferencia es con respecto a los isotipos empleados, determinado a través de la prueba de Duncan con $P < 0.05$.

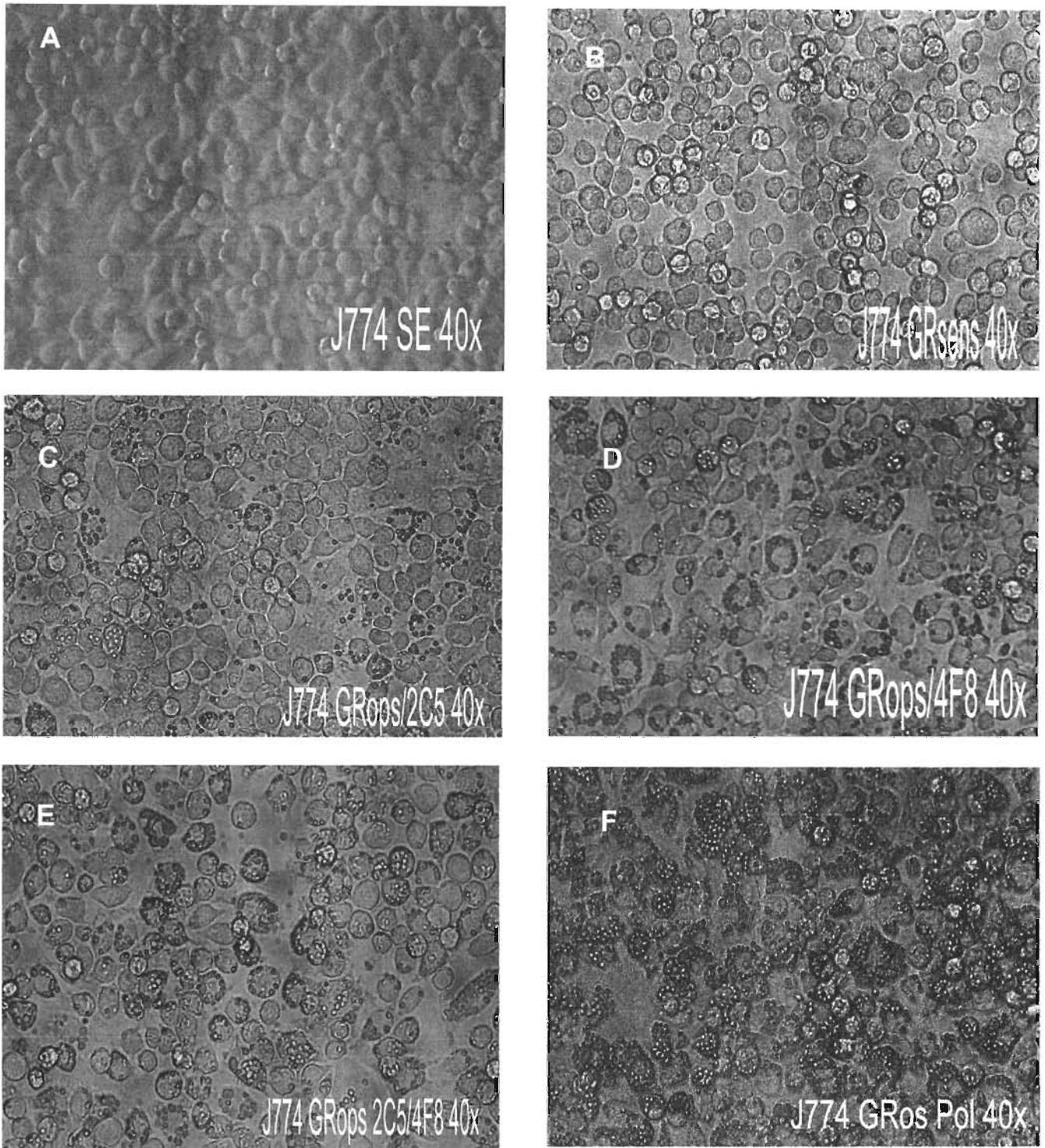


Figura 8. Microfotografías de la fagocitosis de glóbulos rojos de carnero sin opsonizar y opsonizados con IgG1(2C5), IgG2b (4F8), con IgG1 e IgG2b (2C5/4F8) y con anticuerpos policlonales (Pol), todos anti-DNP, en macrófagos de la línea celular J774. Las fotografías se tomaron en un microscopio invertido a un aumento de 40x, a los 45 min de estimulación y después de lisar los eritrocitos sin internalizar. Se observa la diferencia en la cantidad de eritrocitos internalizados con respecto al control. SE: Células sin estimular; GRsens: glóbulos rojos de carnero sólo sensibilizados; GRops: glóbulos rojos de carnero opsonizados.

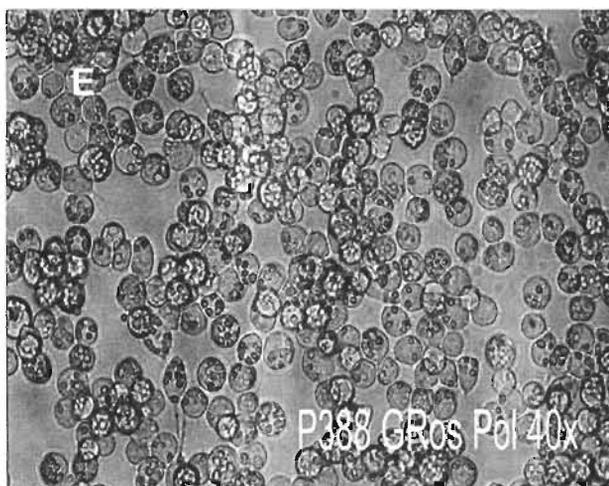
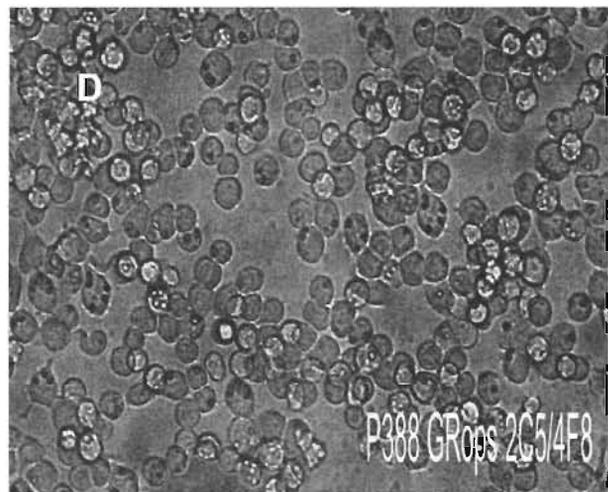
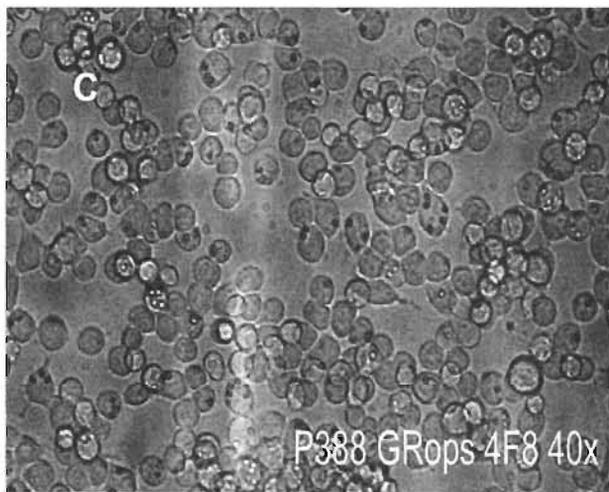
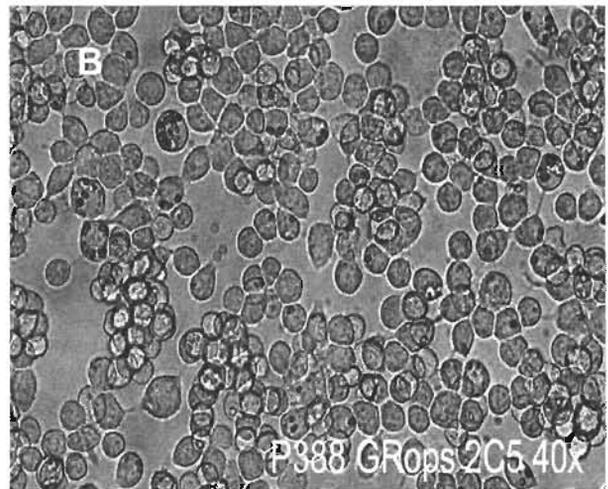
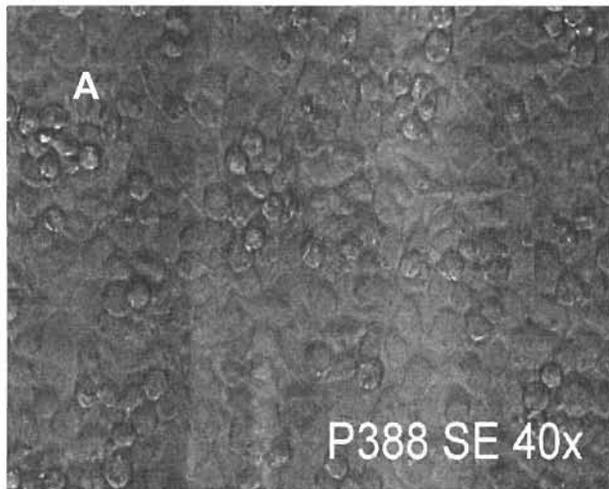


Figura 9. Microfotografías de la fagocitosis de glóbulos rojos de carnero opsonizados con IgG1(2C5), IgG2b (4F8), con IgG1 e IgG2b (2C5/4F8) y con anticuerpos policlonales (Pol), todos anti-DNP, en macrófagos de la línea celular P388. Las fotografías se tomaron en un microscopio invertido a un aumento de 40x, a los 45 min de estimulación y después de lisar los eritrocitos sin internalizar. Se observa la diferencia en la cantidad de eritrocitos internalizados con respecto al control. SE: Células sin estimular; GRsens: glóbulos rojos de carnero sólo sensibilizados; GRops: glóbulos rojos de carnero opsonizados.

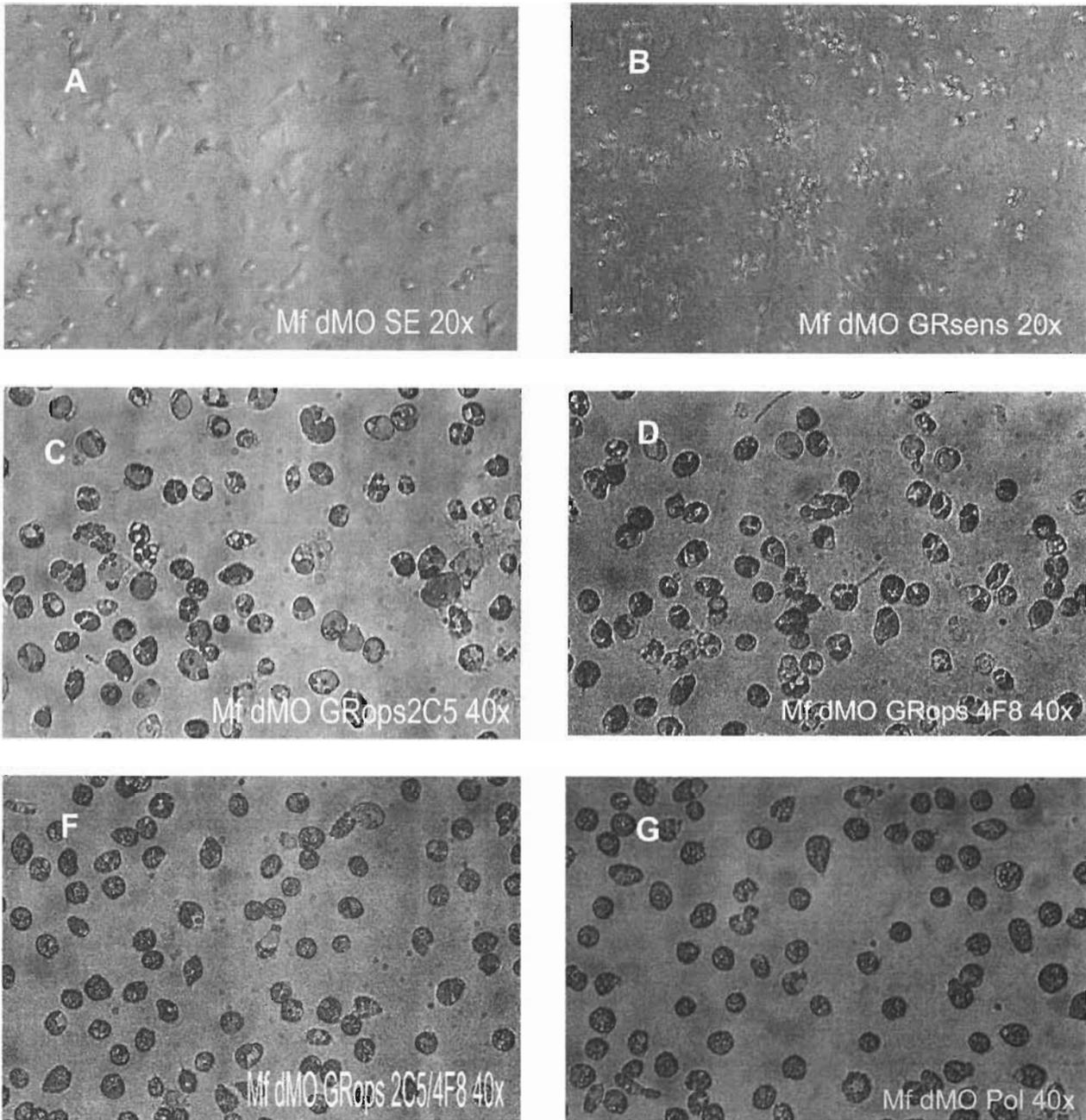


Figura 10. Microfotografías de la fagocitosis de glóbulos rojos de carnero sin opsonizar y opsonizados con IgG1(2C5), IgG2b (4F8), con IgG1 e IgG2b (2C5/4F8) y con anticuerpos policlonales (Pol), todos anti-DNP, en macrófagos derivados de médula ósea de ratón (Mf dMO). Las fotografías se tomaron en un microscopio invertido a 20 y 40x de aumento, a los 45 min de estimulación y después de lisar los eritrocitos sin internalizar. Se observa la diferencia en la cantidad de eritrocitos internalizados con respecto al control. SE: Células sin estimular; GRsens: glóbulos rojos de carnero sólo sensibilizados; GRops: glóbulos rojos de carnero opsonizados.

Influencia del isotipo de IgG en la producción de citocinas mediada por Fc γ R

1. Detección de IL-1 β e IL-6 en sobrenadantes por el método de ELISA

Después de estimular durante 24 horas a los macrófagos murinos con eritrocitos opsonizados con IgG de distinto isotipo, o con LPS (*E.coli* serotipo 0111:B4 a 1 μ g/mL, como control positivo de estimulación), se recolectaron los sobrenadantes y se analizaron por ELISA para la detección de IL-1 β e IL-6. Se construyeron las curvas estándar (**figura 11**) para interpolar los valores de densidades ópticas de las muestras en la curva. Las muestras de sobrenadante se analizaron sin dilución previa. Las muestras provenientes de estimulación con LPS y eritrocitos opsonizados con IgGs anti-DNP policlonal de conejo se diluyeron 1:2, pues los valores de densidad óptica estaban fuera del rango de la curva.

Aún cuando los ensayos de fagocitosis fueron satisfactorios, pues mostraron que los tres tipos de células usadas son capaces de llevar cabo fagocitosis mediada por Fc γ R, la producción de citocinas; en los sobrenadantes no fue detectable por ELISA para IL-1 β ni en J774, ni en P388, ni en macrófagos derivados de médula ósea bajo ningún tratamiento. El sistema de detección funciona adecuadamente, dentro de los límites de sensibilidad a los cuales esperábamos obtener las concentraciones de citocinas en los sobrenadantes; ya que se ha reportado (Musso *et al.*, 2001) que en sobrenadantes de células J774 y estimulando con LPS a una concentración final de 1 μ g/mL, se detectaron 300 pg/mL de IL-1 β y >1.5 ng/mL de IL-6 a las 24 h de estimulación.

En nuestros ensayos sólo en los sobrenadantes de las células estimuladas con LPS se logró detectar IL-6, tanto en las células J774, como en las células P388 y los macrófagos derivados de médula ósea. En las J774, además de las células estimuladas con LPS, también en los sobrenadantes de los macrófagos estimulados con eritrocitos opsonizados con IgGs anti-DNP policlonales de conejo se detectó IL-6; sin embargo en los sobrenadantes de las células estimuladas con eritrocitos de carnero opsonizados con IgG1 o IgG2b, o bien opsonizados con ambos anticuerpos, no se produjo una cantidad de IL-6 detectable ni a las 24 ni a las 48 horas (los datos de las concentraciones de citocinas a las 48 y 72 horas no se muestran, ya que fueron similares a los obtenidos a las 24 horas).

Pensando en que estimular a las células durante tanto tiempo con eritrocitos podría estar afectando la viabilidad de las células y con ello su capacidad de producir citocinas, se probó estimular con los anticuerpos adsorbidos a una placa de cultivo en lugar de estimular con

eritrocitos opsonizados y dejarlos 24 o 48 horas, pero los resultados fueron negativos también (datos no mostrados).

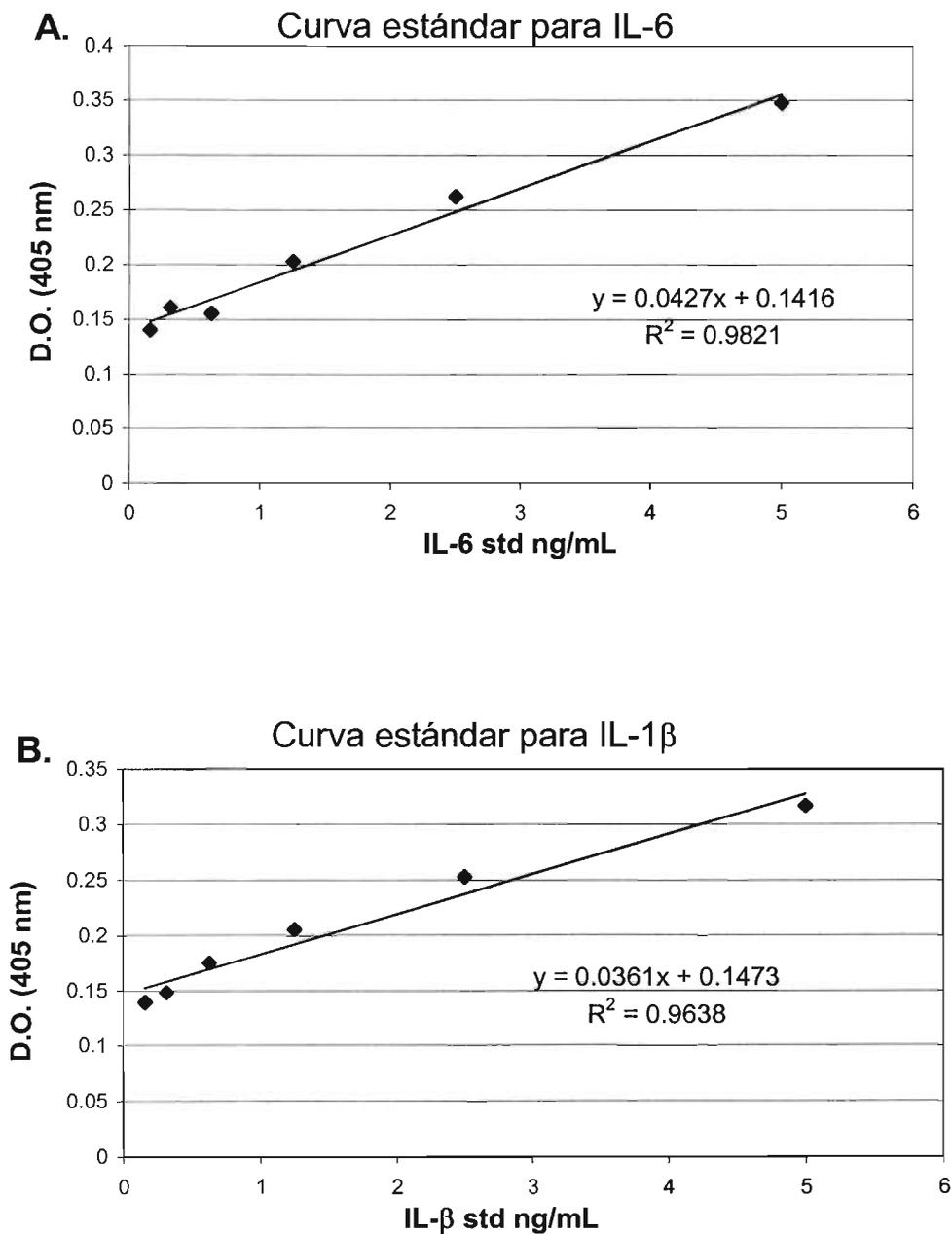


Figura 11. Curvas estándares de IL-6 (A) e IL-1β (B) para la determinación de citocinas en los sobrenadantes por el método de ELISA.

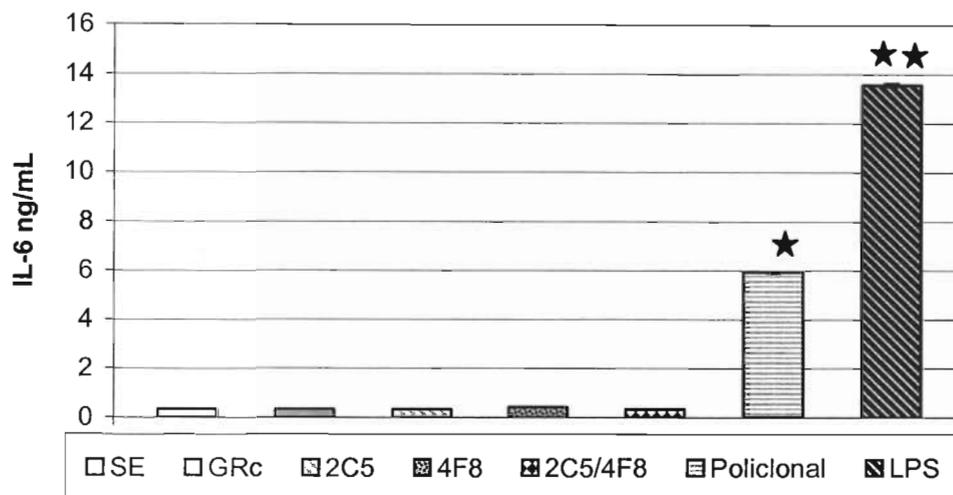


figura 12. Producción de IL-6 en macrófagos de la línea celular J774 estimulados con glóbulos rojos de carnero opsonizados con distintos isotipos de IgG: IgG1(2C5), IgG2b (4F8), con IgG1 e IgG2b (2C5/4F8), con anticuerpos policlonales; todos anti-DNP, y con LPS *E.coli* serotipo 0111:B4 (1µg/mL). Los sobrenadantes se recolectaron a las 24 horas de estimulación y se analizaron por ELISA. Las estrellas indican diferencia significativa en la concentración de IL-6 en ng/mL con respecto al control, y doble si la diferencia es con respecto a los isotipos de IgG, determinado a través de la prueba de Duncan con $P < 0.05$.

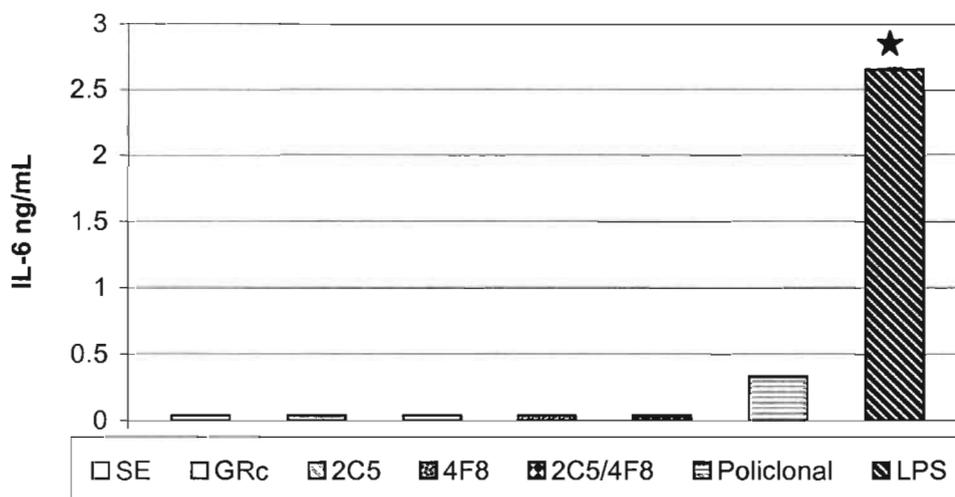


Figura 13. Producción de IL-6 en macrófagos derivados de médula ósea de ratón BALB/c estimulados con glóbulos rojos de carnero opsonizados con distintos isotipos de IgG: IgG1(2C5), IgG2b (4F8), con IgG1 e IgG2b (2C5/4F8), con anticuerpos policlonales; todos anti-DNP, y con LPS *E.coli* serotipo 0111:B4 (1µg/mL). Los sobrenadantes se recolectaron a las 24 horas de estimulación y se analizaron por ELISA. Las estrellas indican diferencia significativa en la concentración de IL-6 en ng/mL con respecto al control, determinado a través de la prueba de Duncan con $P < 0.05$

2. Detección de IL-6 y TNF- α por tinción intracelular

Como metodología alterna para la detección de citocinas, empleamos la técnica de tinción de citocinas intracelulares. Esta técnica incluye el uso de un inhibidor del transporte de proteínas de secreción, lo que pensamos ayudaría a la acumulación de citocinas en el interior de las células facilitando la detección de IL-6 y TNF- α . Para llevar a cabo esta determinación se realizaron estimulaciones por 5 horas de células J774 y P388, utilizando eritrocitos de carnero opsonizados con IgG1, IgG2b, ambas subclases, e IgG policlonal de conejo, así como LPS (*E.coli* serotipo 0111:B4 a 1 μ g/mL) como control positivo de estimulación. Se incluyó un control positivo de tinción (macrófagos de ratón positivas para IL-6 y TNF- α , entre otras citocinas, de BD BioSciences, ver anexo). Se leyó en un citómetro de flujo FACScan BECTON DICKINSON, mediante la tinción de citocinas intracelulares, para IL-6 y TNF- α .

De los tratamientos y células empleadas, únicamente se observó señal positiva en las J774 estimuladas con LPS teñidas contra TNF- α (**figura 14 A**). Para IL-6, ni las J774 ni las P388, con ninguno de los estímulos empleados fueron positivas. Ninguna de las estimulaciones: con eritrocitos opsonizados con 2C5, 4F8 u opsonizados con ambos, o bien con IgGs policlonales de conejo anti-DNP, induce una cantidad de IL-6 o TNF- α detectable a las 5 horas de estimulación por tinción de citocinas intracelulares. En la figura 14B se presenta el histograma de la tinción de TNF- α en células P388 estimuladas con LPS (*E.coli* serotipo 0111:B4 a 1 μ g/mL). En las figuras 15 y 16 se presentan los histogramas para IL-6 de J774 y P388.

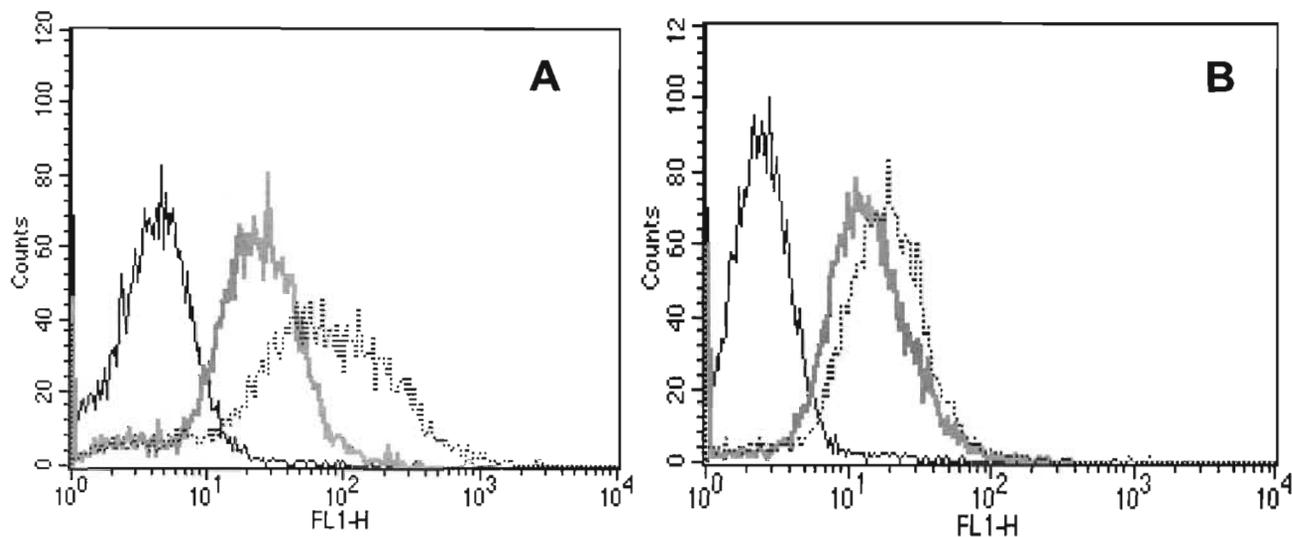


Figura 14. Histograma de células J774 (A) y P388 (B) teñidas para TNF- α . La línea negra corresponde a células que no fueron ni estimuladas ni teñidas, la línea gris a las células sin estimular pero teñidas (TNF- α basal) y la línea punteada es la fluorescencia de las células estimuladas con LPS.

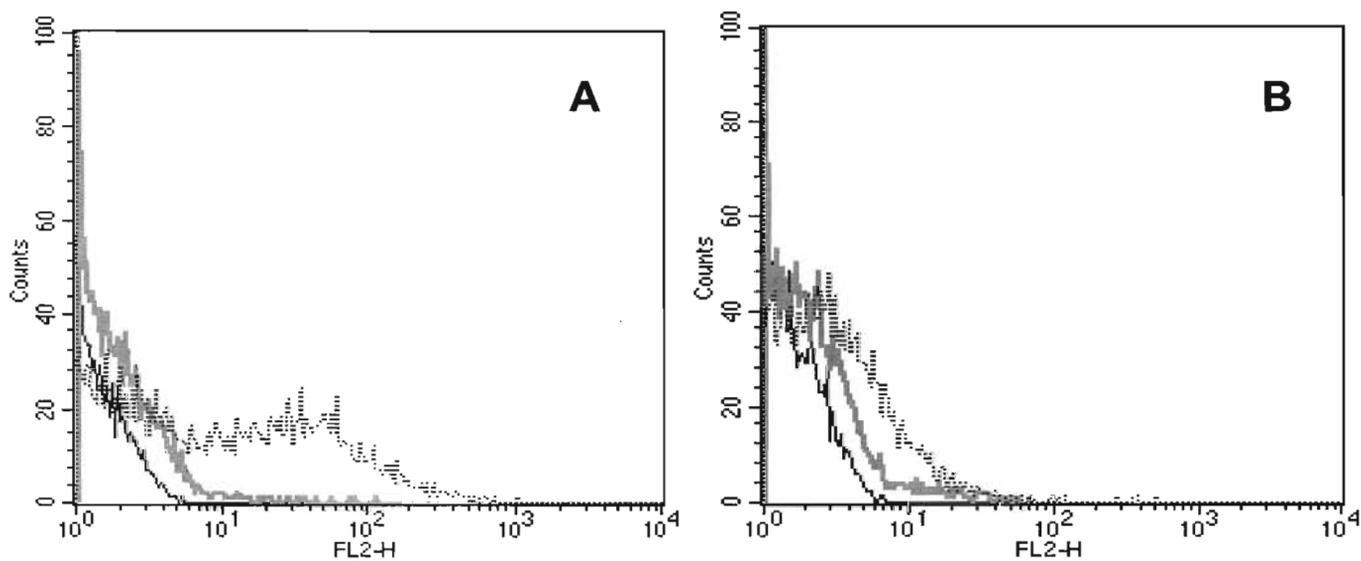


Figura 15. Histograma de células J774 (A) y P388 (B) teñidas para IL-6. La línea negra corresponde a células que no fueron ni estimuladas ni teñidas, la línea gris a las células sin estimular pero teñidas (IL-6 basal) y la línea punteada es la fluorescencia de las células estimuladas con LPS.

Capítulo 6

DISCUSIÓN

Los diversos FcRs son capaces de mediar respuestas celulares similares; sin embargo, no se ha definido claramente si los factores estructurales de los distintos isotipos de IgG pueden afectar la activación/intensidad de esas respuestas.

En este trabajo se observaron diferencias en la capacidad para mediar fagocitosis asociadas a la subclase de anticuerpo usada para opsonizar los eritrocitos de carnero. La subclase IgG1 es menos eficiente que la subclase IgG2b para mediar fagocitosis en las células J774 y P388, mientras que en los Mfd MO la fagocitosis mediada por IgG1 es más eficiente que la IgG2 pero la diferencia no es estadísticamente diferente (**figuras 5-10**). Esto no se debe a que cada subclase tuviera distinta afinidad por el hapteno, pues la constante de afinidad de los anticuerpos de cada subclase para la unión con el hapteno es similar ($K_a \cong 4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$); y al analizar la interacción entre eritrocitos opsonizados con cada subclase con la célula fagocítica tampoco se encontraron diferencias (Garay, 2002).

Con el objetivo de aportar más información al estudio de la participación del isotipo en la respuesta celular, en este trabajo además se analizó si existían diferencias cualitativas y/o cuantitativas en la capacidad para estimular la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) que estuvieran relacionadas con la subclase de anticuerpo que media el estímulo fagocítico.

Los resultados indican que aún cuando las células de las líneas celulares J774, P388 y los MF dMO fagocitan eficientemente los glóbulos rojos de carnero opsonizados, el estímulo no es suficiente para inducir la producción de citocinas en una cantidad detectable ni por ELISA ni por tinción intracelular. Así, por ejemplo, la fagocitosis de los Mf dMO y de las células J774 de eritrocitos opsonizados con IgG2b, que es mucho más alta que la de eritrocitos sin opsonizar, no indujo la producción de IL-6, IL-1 β ni TNF- α en cantidades detectables (**figuras 12-15**). Los Mf dMO tienen la capacidad fagocítica más alta de las células con las que trabajamos, a tal grado que no es posible contar visualmente los eritrocitos internalizados a los 45 min (ni a los 30 tampoco, no se muestran las figuras pero también se ensayó a ese tiempo) pues es tan alto el número de eritrocitos dentro del macrófago, que estos presentan la apariencia de moras repletas, donde ya no es posible contar los eritrocitos internalizados (**figura 10**). sorprendentemente ni aún en esos casos se detectaron IL-6 ni IL-1 β (**figura 13**).

Aunque en las distintas células estudiadas se llevó a cabo el proceso de fagocitosis a través de Fc γ Rs, estimulando con eritrocitos opsonizados con IgG monoclonal, sólo se detectó IL-6 en los sobrenadantes de las células J774 y Mf dMO estimuladas con eritrocitos opsonizados con IgG policlonales anti-DNP preparados en conejo en la línea celular J774 y Mf dMO.

Dado que no se logró inducir producción de citocinas con los distintos isotipos de IgG empleados, los resultados no son concluyentes con respecto de que haya o no diferencias entre los isotipos IgG1 y el IgG2b en la capacidad de estimular la producción de citocinas en los macrófagos murinos J774, P388 y los derivados de médula ósea. Sin embargo al estimular con eritrocitos opsonizados con IgG anti-DNP policlona de conejo si se detectó la producción de IL-6. Por lo tanto se sabe que las células con las que trabajamos son capaces de producir citocinas a través de la agregación de Fc γ Rs.

Con base a estos resultados se propone que: a). la estructura generada de los agregados al entrecruzar los receptores con un sólo isotipo de IgG de ratón, o bien sólo con los isotipos probados, IgG1 e IgG2b, no reúne las características necesarias para inducir la producción de citocinas, lo que si consigue inducir la IgG de conejo; b). quizá ninguna de estas dos subclases, ni opsonizando por separado, ni opsonizando la misma partícula (IgG1/IgG2b), son capaces de reclutar a los receptores necesarios para llevar a cabo la señalización que como punto final induzca la producción de citocinas, aún cuando la señalización sea eficiente para promover fagocitosis.

Las diferencias observadas entre la IgG de conejo y las IgG1 e IgG2b de ratón en la capacidad de inducir la producción y secreción de citocinas pudiera deberse a las diferencias que entre ellas existen:

A. Diferencias en la flexibilidad rotacional. La IgG de conejo posee una flexibilidad rotacional intermedia entre la IgG1, que es la más rígida y la IgG2b que es la más flexible de las IgGs del ratón (Dangl *et al.*, 1988). Quizá la flexibilidad requerida para llevar a cabo la señalización que induzca la producción de citocinas sea precisamente una ni muy rígida ni demasiado flexible, por eso la IgG de conejo si indujo la señal.

Para analizar la posibilidad de que las diferencias en la flexibilidad rotacional estén influyendo en nuestros resultados, tomamos en cuenta otros trabajos, por ejemplo los reportes que existen acerca de ensayos con el sistema IgE-Fc ϵ RI (la inmunoglobulina E y el receptor de alta afinidad para IgE) de células cebadas, en donde se analizó la movilidad rotacional de los complejos anticuerpo-Fc ϵ RI formados por distintos anticuerpos monoclonales específicos para la

subunidad α del receptor. En estos estudios se encontró una relación inversa entre la movilidad del complejo Fc ϵ RI-anticuerpo anti-Fc ϵ RI y la secreción de ácido araquidónico y de leucotrieno C₄; es decir, los complejos Fc ϵ RI-anticuerpo que presentaron mayor movilidad rotacional fueron los menos eficientes para inducir secreción y la producción de ácido araquidónico y de leucotrieno C₄ (Ortega *et al.*, 1989^a; Pecht, 1991). En 1988, Dangl y colaboradores reportaron la existencia de una relación directa entre flexibilidad rotacional y la eficiencia para inducir la fijación de complemento por moléculas de IgG, dónde se comparan moléculas de IgG humanas, de ratón y de conejo. En sus estudios, la IgG2b, que es la más flexible, fija complemento mejor que la IgG1, que es la más rígida, y la IgG de conejo lo hace con una capacidad Intermedia. Estos datos no nada más ilustran que la movilidad rotacional de las IgGs tienen una influencia en la activación de funciones efectoras, sino que sugieren que la flexibilidad rotacional de los anticuerpos influye de manera diferente dependiendo de la función efectora a llevarse a cabo. En el caso de la inducción de producción y secreción de citocinas, la flexibilidad intermedia de los agregados que se formen, pudiera ser crítica para la inducción de la activación de la vía de señalización.

Es posible que la flexibilidad esté afectando otros factores que se requieren para la señalización, como el traslado de los receptores agregados a las balsas lipídicas. Las balsas lipídicas son regiones resistentes a la solubilización con detergentes, ricas en colesterol y glucolípidos, considerados por muchos autores como el sitio de iniciación y propagación de los eventos de señalización. Se les ha estudiado en una gran diversidad de células, pero tienen particular importancia en las células del sistema inmune. En las células no activadas las balsas lipídicas flotan libremente, pero cuando las células se activan se forman "plataformas" que llevan consigo a las proteínas que actuarán en la señalización (Brandenburg K *et al.*, 2001). Ejemplos de proteínas que se han encontrado en las balsas lipídicas incluyen al Fc ϵ RI, así como a Fc γ Rs (Fc γ RIIA y Fc γ RIII); CD48 y CD58, que son moléculas de adhesión y coestimuladoras, respectivamente, y CD14, el receptor para LPS bacteriano (Brandenburg K *et al.*, 2003; Dykstra *et al.*, 2003). Además se han encontrado en células estimuladas o en reposo a las cinasas de la familia Src (que son las responsables de la fosforilación de los ITAMs de los FcRs) y las cinasas Syk, Lyn y Fyc, entre otras, que participan en la propagación de la señal de activación (Kwiatkowska *et al.*, 2003). Se ha demostrado que algunos de los receptores de la familia de los MIRRs como son el TCR, BCR, Fc ϵ RI, Fc α R, Fc γ RIIA y Fc γ RIII son reclutados a las balsas después del entrecruzamiento y fosforilación catalizada por las cinasas de la familia Src residentes en las balsas y/o relocalizadas de otros sitios vecinos a los receptores (Shenoy-Scaria *et al.*, 1993; Rodgers *et al.*, 1994; Kabouridis *et al.*, 1997; van't Hof y Resh, 1997;

Kwiatkowska *et al.*, 2003). Kwiatkowska y colaboradores determinaron que para el caso del Fc γ R1IA en células U937, el rearrreglo de actina y la polarización de los receptores que permiten la internalización de una partícula depende de la presencia de las balsas lipídicas. Ellos proponen que la fosforilación en tirosina de los Fc γ R1IA por las cinasas de tirosina de la familia Src residentes en las balsas lipídicas activan la vía de señalización que controla el rearrreglo del citoesqueleto requerido para que el Fc γ R1IA medie motilidad celular que genere la formación de pseudópodos y del fagosoma.

Todos estos datos sugieren que: a). dado que se han encontrado a los Fc γ R en las balsas después de la agregación de los receptores, así como a las cinasas que se encargan de fosforilar los ITAMs de los FcRs y a las cinasas que siguen en la cascada de señalización, como Syk; b). se ha determinado que la presencia de los agregados de los receptores y sus ligandos en las balsas lipídicas es requisito para que se generen algunas de las actividades efectoras de las células como la fagocitosis por ejemplo; c). la señalización no sólo lleva al rearrreglo de actina necesario para la fagocitosis, sino que entre otras actividades celulares, lleva a la activación de factores de transcripción como son AP-1 y NF κ B, que son los que promueven la transcripción de las citocinas proinflamatorias estudiadas en este trabajo; nosotros proponemos que factores estructurales y configuracionales de los agregados IgG-Fc γ R influya en el traslado de estos agregados a esas zonas donde se amplifica la señal y por lo tanto influyan en que se active la vía de transducción necesaria para que se lleve a cabo la transcripción de los genes para IL-6, IL-1 β y TNF- α , así como a la secreción de estas citocinas.

B. Diferencias en la afinidad. Se realizaron ensayos de rosetas con eritrocitos opsonizados con IgG de ratón (IgG1 e IgG2b) y de conejo, y se determinó que no había diferencias entre la capacidad de los macrófagos de la línea celular J774 de unir a través de Fc γ Rs a los eritrocitos recubiertos, y se probó además que entre isotipos, los anticuerpos anti-DNP se unen con la misma afinidad al hapteno con que se sensibilizó a los eritrocitos (Garay, 2002). En este trabajo no se determinó la afinidad de los anticuerpos por los Fc γ Rs, pero el hecho de que no se observaran diferencias en la formación de rosetas entre las células P388 y J774 y GRc opsonizados con los distintos isotipos de IgG de ratón y conejo; justifica que se piense que no hay diferencias significativas en las afinidades entre los Fc γ Rs y las IgGs. Sin embargo, tal vez el efecto que se observó, de que ni la IgG1 ni la IgG2b indujeron producción de IL-6 y la IgG policlonal de conejo sí, puede deberse a que la IgG de conejo posee una mayor afinidad por su receptor en el macrófago que las otras dos inmunoglobulinas lo que se traduce en una

interacción quizá más intensa por que es mayor duración, y al permanecer más tiempo unida a su receptor que en forma “libre”, se tiene por más tiempo a los ITAMs fosforilados y a la cascada completa amplificando esa señal, por lo cual se favorecería a la activación de los factores de transcripción que promueven la expresión de los genes de citocinas proinflamatorias, NF κ B y Ap-1, entre otras funciones celulares de activación.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Capítulo 7

CONCLUSIONES

- En las líneas celulares J774 y P388, los anticuerpos de la subclase IgG2b son más eficientes que los anticuerpos de la subclase IgG1 para mediar fagocitosis.
- En los macrófagos derivados de médula ósea los anticuerpos de la subclase IgG1 es más eficiente que la IgG2b para mediar fagocitosis, sin embargo no hay diferencias estadísticamente significativas.
- La IgG de conejo es la más eficiente de las IgGs con que se trabajó para mediar fagocitosis tanto en las líneas celulares J774 y P388 como en los macrófagos derivados de médula ósea.
- La fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados con IgG no está acoplada de una manera lineal a la inducción de la producción de citocinas en las células J774, P388 ni en macrófagos derivados de médula ósea.
- En macrófagos derivados de médula ósea y en la línea celular J774 la fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados con IgG de conejo induce la producción de IL-6, pero no es capaz de inducir niveles de IL-1 β ni de TNF- α , que sean detectables por ELISA o por citometría de flujo.
- El entrecruzamiento de los Fc γ Rs con los isotipos IgG1 e IgG2b no induce la producción y secreción de las citocinas IL-6, IL-1 β y TNF- α en niveles detectables ni por ELISA ni por citometría de flujo, cuando recubren a una partícula por separado o cuando se opsoniza con una mezcla de ellos, en las líneas celulares J774 y P388 así como en macrófagos derivados de médula ósea.

ANEXO

I. LÍNEAS CELULARES

J774: Son macrófagos, obtenidos de ascitis de ratones hembra con linfoma BALB/cN. Son células adherentes, con morfología de macrófago. Expresan receptores para el componente 3 del complemento (C3) y FcγRI, entre otros. Para el desarrollo de este trabajo se descongelaron células que se preservaban a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, que el laboratorio adquirió del ATCC.

P388: Macrófagos, obtenidos de ratones con linfoma. Son células adherentes, con morfología característica de macrófago. Las células P388 con las que desarrollamos esta trabajo nos las proporcionó la Dra. Beatriz Gómez, del departamento de Virología de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M.

L-929: Fibroblastos de tejido conectivo de ratón. Son adherentes, crecen formando una monocapa, se despegan usando 1:10 de tripsina en medio de cultivo. Se duplican cada 21-24 horas. Las células L-929 con las que desarrollamos este trabajo nos las proporcionó el Dr. Alejandro Zentella, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "Salvador Zubirán".

II. MEDIOS

D-MEM y RPMI

Para 1 litro de medio D-MEM se disuelve el contenido de un sobre de medio en polvo en un litro de agua desionizada, agregando 3.7 gramos de bicarbonato de sodio (NaHCO_3). Se ajusta el pH a 7.1, se esteriliza por filtración y se guarda a temperatura ambiente y cubierto de la luz. Para 1 litro de medio RPMI se disuelve el contenido de un sobre de medio en polvo en un litro de agua desionizada, agregando 2.2 gramos de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), 6.0 gramos de HEPES, 7.8 μL de β -mercaptoetanol (dilución 1:100 en agua destilada). Se ajusta el pH a 7.2, se esteriliza por filtración y se guarda a temperatura ambiente y cubierto de la luz. Ambos medios se dejan en prueba de esterilidad por lo menos 3 días a temperatura ambiente. Posteriormente estos medios se adicionaron con distintos componentes según los requerimientos de cada tipo celular y ensayo (ver anexo y **tabla 4**).

Tabla.4 Requerimientos de SFB de cada línea celular.

Células	% de suero fetal bovino con que se complementó	Medio
J774	10	D-MEM
L-929	5	D-MEM
Mf dMO	10	D-MEM
P388	5	RPMI

D-MEM complementado al 5 ó 10%

SFB	5 ó 10 %
penicilina	100 U/mL
estreptomicina	100 $\mu\text{g/mL}$
L-glutamina	2 mM
piruvato de sodio	1 mM
β -mercaptoetanol	50 μM

RPMI complementado

SFB 5 %
 β -mercaptoetanol 1:10⁶ (v/v)

Medio de médula ósea

D-MEM suplementado 66 %
sobrenadante de cultivo de células L-929 30 %
SFB 4 %
penicilina 100 U/mL
estreptomicina 100 μ g/mL

D-MEM complementado con EDTA

1 mL de EDTA 50x/50 mL de medio
concentración final: EDTA 0.01 M

EDTA 50x

48.6 g (0.5M) EDTA
ajustar a pH= 8.0 llevar a 250 mL con agua desionizada.
Esterilizar por filtración en membrana de 0.22 μ m
Conservar a temperatura ambiente

D-MEM complementado con inhibidores de proteasas

D-MEM suplementado.
1 tableta de un cocktail de inhibidores de proteasas /10 mL de medio.
(Complete Mini, EDTA -free, 25 tablets, Cat. No. 11 836 170 001, ROCHE).
Esterilizado por filtración con membrana de 0.22 μ m.

III. AMORTIGUADORES

PBS 20 x

7.2 g NaH₂PO₄•H₂O (2.6 mM)
22 g NaHPO₄ anhidro (7.74 mM)
ó 55.4 g NaH₂PO₄•12 H₂O
175 g Na Cl (0.16 mM)
Ajustar a pH=7.5 con lentejas de NaOH.
Aforar a 1L de agua desionizada.

DGVB²⁺

0.25 g gelatina (calentar < 45 ° C)
0.23 g barbital
12.5 g dextrosa
2.1 g NaC
75 μ L CaCl₂ 1M
25 μ L MgCl₂ 1M
Ajustar a pH= 7.5 llevar a 500 mL con agua desionizada.
Esterilizar por filtración en membrana de 0.22 μ m.
Conservar a 4°C.

ALSEVERS

10.25 g dextrosa

2.1 g NaCl

4 g citrato de sodio •2H₂O

0.275 g ácido cítrico •H₂O

Ajustar a pH= 6-6.2 y aforar a 500 mL de agua desionizada.

Esterilizado por filtración en membrana de 0.22 µm.

Conservar a 4°C.

BORATOS

6.18 g (0.2 M) ácido bórico

4.38 g (0.15M) NaCl

Ajustar a pH= 8.5 y aforar a 500 mL de agua desionizada.

Esterilizado por filtración en membrana de 0.22 µm. Conservar a 4°C.

IV. SOLUCIONES PARA ELISA

Solución de bloqueo

sucrosa 5%

NaN₃ 0.05%

BSA 1%

Disolver en PBS pH=7.4.

Solución de dilución (std., ab.det. y estrepPx)

BSA 1%

Disolver en PBS pH 7.4.

Solución de lavados

Tween 20 0.05%

Disolver en PBS 1x pH 7.4.

V. SOLUCIONES PARA TINCIÓN INTRACELULAR DE CITOCINAS

AMORTIGUADOR DE TINCIÓN

PBS

1 % de suero fetal bovino inactivado

0.09 % (p/v) azida de sodio

Ajustar a pH= 7.4 –7.6 y filtrar en membrana de 0.22 µm.

Conservar a 4°C.

SOLUCIÓN FIJADORA

Paraformaldehído al 4 % p/v

Disolver en PBS pH 7.5.

Conservar protegida de la luz a 4°C

BD Cytofix/Cytoperm Plus™ Kit (con GolgiStop™).

125 mL Solución BD Cytofix/Cytoperm (contiene paraformaldehído al 4% p/v en PBS).

100 mL Solución BD Perm/Wash 10x (contiene saponina, diluir para su uso en agua destilada).

0.7 mL de Solución BD GolgiStop (contiene monensina, inhibidor del transporte de proteínas, diluir 4 μ L/6mL de medio de cultivo).
BDBiosciences, Cat. No. 554715.

CONTROL POSITIVO DE TINCIÓN INTRACELULAR DE CITOCINAS

Macrófagos de ratón estimulados en presencia de un inhibidor del transporte de proteínas, fijadas pero sin permeabilizar, congeladas a -80°C en DMSO al 10% en SFB. MiCK-3: Mouse intracellular CytoKine-3; positivas para IL-1 α , IL-6, IL-12, MCP-1 y TNF- α . BD Biosciences, Cat. No. 554654.

VI. ANTICUERPOS

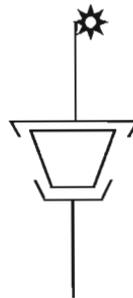
A. PARA ELISA SANDWICH



AntiIL-1 β biotinilado:
IgG anti IL-1 β de ratón, preparado en
cabra (R&D, Cat. No. BAF401).

IL-1 β : recombinante preparado en *E.*
coli (R&D, Cat. No. 401-ML).

Anti IL-1 β :
IgG preparado en hibridoma, anti IL-1 β
de ratón (R&D, Cat. No. MAB401).



AntiIL-6 biotinilado:
IgG anti IL-6 de ratón, preparado en
cabra (R&D, Cat. No. BAF406).

IL-6: recombinante preparado en *E.*
coli (R&D, Cat. No. 406-ML).

Anti IL-6:
IgG preparado en hibridoma, anti IL-6
de ratón (R&D, Cat. No. MAB406).

B. Anticuerpos ANTI-DNP

- Policlonales de conejo anti-DNP*: IgG, purificados por cromatografía de afinidad en columna de DNP-cefarosa, preparado en nuestro laboratorio.
- IgG1 de ratón*: Monoclonal anti-DNP, producido por el hibridoma 4F8. Purificado por cromatografía de afinidad en columna de DNP-cefarosa, hibridoma 4F8, preparado en nuestro laboratorio.
- IgG2b de ratón*: Monoclonal anti-DNP, producido por el hibridoma 2C5. Purificado por cromatografía de afinidad en columna de DNP-cefarosa, hibridoma 2C5, preparado en nuestro laboratorio.

C. Anticuerpos para tinción intracelular de citocinas

- Anti-TNF- α** : IgG1 de rata Anti-TNF- α contra TNF- α de ratón producido por el hibridoma MP6-XT22, marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). BD Bioscience, Cat. No. 554418.
- Anti-IL-6**: IgG1 de rata Anti-IL-6 contra IL-6 de ratón producido por el hibridoma MP5-20F3, marcado con ficoeritrina (PE). BD Bioscience, Cat. No. 554401.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A.K. *et al.*, *Cellular and Molecular Immunology*, China, SAUNDERS, 5ª edición, 2003.
- Aderem A y Underhill DM, 1999, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*, Annual Review of Immunology, 17: 593-623.
- Ades A *et al.*, 1976, *Análisis of mononuclear cell surface whit fluoresceinated staphylococcal protein A complexed whit IgG antibody or heat-aggregated γ globulin*, Journal of Immunology, 117:2119-2123.
- Auger MJ *et al.*, 1992, *The biology of the macrophage*, En The Macrophage, Editada por Lewis CE y McGree J. O'D, Editorial IRL Press, U.S.A.
- Balkwill F, 2001, *Cytokines*, En Enciclopedia of life sciences, Nature Publishing Group, ISSN 1476-9506, www.els.net.
- Bogdan C, 2001, *Macrophages*, En Enciclopedia of life sciences, Nature Publishing Group, ISSN 1476-9506, www.els.net.
- Brandenburg K y Holst O, 2003, *Glycolipids: Distribution and Biological function*, En Enciclopedia of life sciences, Nature Publishing Group, ISSN 1476-9506, www.els.net.
- Bruggemann MG *et al*, 1987, *Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies*, Journal of Experimental Medicine, 166: 1351-1361.
- Burdon, *et al.*, 1988, *Molecular recognition of antibody (IgG) by cellular Fc receptor (FcRI)*, *Molecular Immunology*, 25 (11): 1175-81.
- Daëron M, 1997, *Fc Receptor biology*, Annual Review of Immunology, 15: 203-234.
- Dangl JL *et al.*, 1988, *Segmental flexibility and complement fixation of genetically engineered chimeric human, rabbit and mouse antibodies*, The EMBO journal, 7:1989-1994.
- Deisenhofer J, 1981, *Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex whit fragment B of protein A from Staphylococcus aureus at 2.9-2.8 Å resolution*, Biochemistry, 20:2361-2370.
- Der Bailan *et al.*, *Subclass restriction of murine antibodies. III. Antigens that stimulate IgG3 in mice stimulate IgG2c in rats*. Journal of Experimental Medicine, 152(1):209-18.

- Dykstra *et al.*, 2003, *Location is everything: Lipid rafts and immune cell signaling*, *Annual review of Immunology*, 21:457-81.
- Eisen HN *et al.*, 1966, *Preparation and characterization of antibodies specific for the 2,4,6-trinitrophenyl group*, *Biochemistry*, 11: 3385-95.
- Garay, 1994, *Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales murinos de la clase IgG, específicos para el 2,4-dinitrofenol*, Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México.
- Garay, 2002, *Influencia de la subclase de IgG en la fagocitosis mediada por receptores para Fc*, Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM, México.
- Greenwood J *et al.*, 1993, *Structural motifs involved in human IgG antibody effector functions*, *European Journal of Immunology*, 23:1098-1104.
- Grell M y Scheurich P, 2001, *Tumour necrosis factors*, En *Enciclopedia of life sciences*, Nature Publishing Group, ISSN 1476-9506, www.els.net.
- Harris *et al.*, 1998, *Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody*, *Journal of molecular Biology*, 275, 891-872.
- Hogarth PM, 2002, *Fc Receptors are de major mediators of antibody based inflammation in autoimmunity*, *Current Opinion in Immunology*, 798-802.
- Janeway CA, *et. al.*, *Immunobiology: The immune system in health and Disease*, U.S.A., Current Biology GARLAND, 4^a edición, 1999.
- Jeddi-Tehrani *et al.*, 1992, *Potentiation of transmembrane signaling by cross-linking of antibodies against the beta chain of the T cell antigen receptor of JURKAT T cells*, *Cellular Immunology*, 141(1):1-9.
- Jefferis R *et al.*, 1997, *Molecular definition of interaction sites on human IgG for Fc receptors (huFcγR)*, *Molecular Immunology*, 27: 1237-1240.
- Kabouridis *et al.*, 1997, *S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in Tlymphocytes*. *Journal of EMBO* 16: 4983-4998.
- Kato K *et al.*, 2000, *A conformational change in the Fc precludes the binding of two Fcγ receptor molecules to one IgG*, *Immunology Today*, 21:310.
- Kolar GR y Capra JD, 2003, *Immunoglobulins: structure and function*, En *Fundamental Immunology*, Editado por Paul W, Lippincott Williams and Wilkins, 5^a edición, U.S.A.

- Kwiatkowska *et al.*, 2003, *Phosphorylation of FcγRIIA is required for the receptor-induced actin rearrangement and capping: the role of membrane rafts*. Journal of cell Science, 116(Pt3):537-50.
- Lappin D and Whaley K, 1993, *Complement and the monocuclear phagocyte system*, En Blood cell Biochemistry: Macrophages and related cells, Editado por Horton MA, Volumen 5, 1ª edición, PLENUM, New York.
- Leenen P and Campbell P, 1993, *Heterogeneity of monocuclear phagocyte*, En Blood cell Biochemistry: Macrophages and related cells, Editado por Horton MA, Volumen 5, 1ª edición, PLENUM, New York.
- Lewis CE *et al.*, 1992, *The Macrophage*, Oxford University Press.
- Lund J *et al.*, 1992, *Multiple binding sites on the C_H2 domain of IgG for mouse FcγRII*, Molecular Immunology, 29:53.
- Metzger H, 1990, *Structure and function of antibodies*, En Fc Receptors and the action of antibodies, Editado por Metzger H, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Mire-Sluis AR, 2001, *Interleukines*, En Enciclopedia of life sciences, Nature Publishing Group, ISSN 1476-9506, www.els.net.
- Musso *et al.*, 2001, *Interaction of Bartonella henselae with de murine macrophage cell line J774: infection and proinflammatory response*, Infection and Immunity, 69 (10) 5974-80.
- Neuberger MS *et al.*, 1981, *Activation of mouse complement by monoclonal mouse antibodies*, European Journal of Immunology, 11:1012-1016.
- Nezlin R, 1998, *The immunoglobulins*, Structure and function, Academic Press.
- Nimmerjahn F *et al.*, 2005, *FcγRIV: A novel FcR with distinct IgG subclass specificity*, Immunity, 23:41-51.
- Oi VT *et al.*, 1984, *Correlation between segmental flexibility and effector function of antibodies*, Nature, 307:136-140.
- Ortega E *et al.*, 1988, *Possible orientational constrains determine secretory signals by aggregation of IgE receptors on mast cells*, Journal of EMBO, 7:4101-9.
- Ortega E *et al.*, 1989, *Receptor-effector coupling processes probed by monoclonal antibodies*, Progress in Clinical Biology Res. 1989;289:317-26.
- Pleiman *et al.*, 1994, *The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction*, Immunology today, 15(2):393-9.

- Ravetch, 1991, *Fc receptors*, Annual Review of Immunology, 9:457-92.
- Rodgers *et al.*, 1994, *Signals determining protein tyrosine kinase and glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein targeting to a glycolipid-enriched membrane fraction*. Molecular Cellular Biology, 14:5384-5391.
- Santoyo, 2004, *Estudio de las vías bioquímicas involucradas en la señalización mediada por los Fc γ R*, Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM, México.
- Sarmay G *et al.*, 1992, *Mapping and comparison of the interactions sites on the Fc region of IgG responsible for triggering antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) through different types of human Fc γ receptor*. Molecular Immunology, 29: 633-639.
- Shenoy-Scaria *et al.*, 1993, *Palmitoylation of an amino-terminal cysteine motif of protein tyrosine kinase p56lck and p59fyn mediates interaction with glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins*. Molecular Cellular Biology, 13: 6385-6392.
- Slack JH *et al.*, 1980, *Subclass restriction of murine antibodies. II. The IgG plaque-forming cell response to thymus-independent type 1 and type 2 antigens in normal mice and mice expressing an X-linked immunodeficiency*, Journal of Experimental Medicine, 151(4):853-62.
- Turpin JA and Lopez-Berestein G, 1993. *Differentiation, Maturation and Activation of monocytes and macrophages: functional activity is controlled by continuum of maturation*, En Mononuclear phagocytes in cell biology, Editado por Lopez-Berestein and Klostergaard, CRC Press, U.S.A.
- Urbanek R, 1988, *IgG subclasses and subclass distribution in allergic disorders*, En Monographs in Allergy, Vol. 23, Skvaril F, Editado por Karger S y Switzerland B.
- Van Vugt y Van de Winkel, 2001, *Fc Receptors*, En Enciclopedia of life sciences, Nature Publishing Group, ISSN 1476-9506, www.els.net.
- van't Hof *et al.*, 1997, *Rapid plasma membrane anchoring of newly synthesized p59fyn: selective requirement for NH₂-terminal myristoylation and palmitoylation at cysteine-3*. Journal of Cellular Biology, 136:1023-1035.
- Woof JM y Burton DR, 2004, *Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures*, Immunology, Nature Reviews, 4: 1-11.