



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

LABORATORIO DE DIFERENCIACION  
CELULAR Y CANCER

LOS RECEPTORES  $Fc$  INDUCIDOS POR IL-1 EN  
MACROFAGOS RESIDENTES DE LA CAVIDAD  
PERITONEAL DE RATON SON BLOQUEADOS POR  
IgG, AUMENTAN SU AFINIDAD MEDIANTE EL  
TRATAMIENTO CON TRIPSINA Y SON  
RECONOCIDOS POR UN ANTICUERPO CONTRA  
INMUNOGLOBULINAS DE RATON.

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A  
EDGAR VALENCIA MORALES

MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

	Página
Resumen	1
Introducción	2
Marco Teórico	3
Citocinas	3
Hematopoyesis y HGF'S	4
Interleucina 1	11
Receptores de Interleucina 1	13
Fuentes y Estímulo de Producción de Interleucina 1	15
Efectos de Interleucina 1	16
Control de Interleucina 1	19
Interferón Gamma	20
Macrófagos Residentes	23
Inmunoglobulinas	25
Receptores Fc	28
Receptor para Inmunoglobulina G tipo I (FcγRI)	29
Efectos y Regulación de la Expresión de FcγRI	31
Receptor para Inmunoglobulina G tipo II (FcγRII)	32
Efectos y Regulación de la Expresión de FcγRII	34
Receptor para Inmunoglobulina G tipo III (FcγRIII)	35
Efectos y Regulación de la Expresión de FcγRIII	36
Planteamiento del Problema	40
Hipótesis	41
Objetivos	41
Materiales y Métodos	42
Resultados	46
Discusión	58
Conclusiones	62
Bibliografía	63
Apéndices	77

## RESUMEN

Interleucina 1 (IL-1) es una molécula glicoprotéica con una gran cantidad de efectos, que comparten el común denominador de ser integrantes de la respuesta inflamatoria ante un reto antigénico. Una de las propiedades más importantes de la Interleucina 1 es su capacidad de inducir receptores para la porción Fc de la Inmunoglobulina G (FcγR) en células de tipo macrófágico. Esta capacidad de inducción reviste interés debido a que es a través de estos receptores que se enlazan las ramas humoral y celular del sistema inmune, lo cual a su vez desemboca en una mejor capacidad de defensa contra agentes infecciosos. A la fecha se han descrito 3 diferentes tipos de FcγR distinguibles en base a sus afinidades por las diferentes subclases de inmunoglobulina, su resistencia al tratamiento con tripsina y en el humano, en base también a su reactividad con anticuerpos monoclonales específicos.

Sin embargo, en los estudios donde se ha observado la capacidad inductora de FcγR por parte de IL-1 en macrófagos de ratón, no se han determinado las propiedades mencionadas de los receptores inducidos por ella y por lo tanto no se pueden hacer conjeturas cerca del receptor o receptores inducidos por esta molécula.

De esta forma, en el presente trabajo se determinaron las características de los receptores Fc inducidos por IL-1 en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón. Para ello, las células se cultivaron durante 2 días en presencia del factor para posteriormente desarrollar ensayos de formación de rosetas con o sin tratamiento previo con suero de ratón, ensayos de formación de rosetas después de tratamiento con tripsina y ensayos de inmunofluorescencia indirecta.

Los resultados indicaron que los receptores inducidos por IL-1 son bloqueados por inmunoglobulinas del suero de ratón, aumentan su afinidad mediante el tratamiento con tripsina y aunque no presentaron reactividad con los anticuerpos contra los FcγR humanos del ensayo de inmunofluorescencia, fueron reconocidos por el anticuerpo contra inmunoglobulinas de ratón.

Esto nos conduce a pensar que IL-1 induce FcγR de tipo II, aunque no se puede descartar la posibilidad de que induzca a los otros FcγR.

## INTRODUCCION

La mayor parte de los procesos que se desarrollan en nuestro organismo son regulados por moléculas sintetizadas en órganos específicos denominadas hormonas o por factores de naturaleza proteica sintetizados por células especializadas conocidos como citocinas (1). Una de las citocinas más importantes es conocida como Interleucina 1.

La Interleucina 1 (IL-1) es una glicoproteína con un peso molecular de 17 kilodaltons (kD) de la cual se presentan 2 formas que difieren en su punto isoelectrico (pI). La IL-1 $\beta$  posee un pI de 5, mientras que la IL-1 $\alpha$  tiene pI de 7. A pesar de la diferencia en sus pI, ambas formas de IL-1 son capaces de generar los mismos efectos en diferentes células del organismo a través de la interacción con receptores específicos. A la fecha son más de 50 efectos los que se le han atribuido a IL-1 y que incluyen procesos inflamatorios, inmunológicos, metabólicos y hematopoyéticos. (2)

En el laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Zaragoza se han desarrollado estudios con esta molécula acerca de su propiedad de inducir la expresión de receptores para la porción Fc de la Inmunoglobulina G (Fc $\gamma$ R) en células normales y leucémicas de ratón y humano (3, 4). Se ha centrado la atención en los Fc $\gamma$ R ya que estas moléculas son el enlace entre las ramas humoral y celular de la respuesta inmune. A través de la interacción de las Inmunoglobulinas con los Fc $\gamma$ R se desencadenan respuestas como fagocitosis, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y liberación de citocinas (5). Los estudios realizados a la fecha han demostrado que IL-1 es capaz de incrementar la expresión de los Fc $\gamma$ R en las células de tipo monocito-macrófago, tanto de ratón y humano, normales y leucémicas en forma similar a como lo hace otra molécula que ha sido conocida por poseer esta propiedad desde hace algún tiempo, el Interferón Gamma (IFN $\gamma$ ) (5). Sin embargo, no se ha podido determinar que tipo de receptor Fc es el inducido por IL-1 en los macrófagos de ratón considerando características como bloqueo por inmunoglobulinas séricas, resistencia a tratamiento con tripsina y posible reconocimiento mediante anticuerpos monoclonales contra los receptores humanos. A la fecha se han reportado 3 tipos diferentes de Fc $\gamma$ R tanto en ratón como humano que han sido denominados como Fc $\gamma$ RI a III. Se ha reportado también que IFN $\gamma$  es capaz de inducir los receptores tipo I y III mientras que IL-1 induce los receptores tipo I y II (6, 7), aunque en las investigaciones con IL-1 para poder observar su efecto inductor se ha tenido que combinar con otras moléculas, por lo que el efecto observado no es claramente atribuible a ella.

De esta forma en la presente investigación se determinaron las características de bloqueo por inmunoglobulinas séricas, resistencia a tripsina y posible reconocimiento por anticuerpos monoclonales contra Fc $\gamma$ R humanos de los receptores Fc inducidos por IL-1 en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón.

Los resultados indicaron que los receptores inducidos por IL-1 son bloqueados por inmunoglobulinas del suero de ratón, aumentan su afinidad mediante el tratamiento con tripsina y son reconocidos por un anticuerpo fluoresceinado contra inmunoglobulinas de ratón.

Nuestras evidencias parecen indicar que IL-1 induce receptores para Fc tipo II de un tipo muy particular, aunque para confirmar esta hipótesis es necesario emplear otras técnicas en su estudio.

## MARCO TEORICO

### CITOCINAS

Las citocinas son glicoproteínas extracelulares secretadas por células específicas (efectoras), cada una producto de un gen particular aunque puede haber algunas de ellas estrechamente relacionadas (1). Las citocinas se caracterizan por tener la habilidad de modificar el comportamiento de las células vecinas (acción parácrina) o el propio (acción autócrina). Estas moléculas son importantes mediadores del desarrollo, función y control del sistema inmune y otros sistemas desarrollando sus efectos a bajas concentraciones (8). No recorren grandes distancias para ejercer su función, esto las distingue de las hormonas y provoca que sean difíciles de detectar en el plasma. Su amplio espectro de acción hace pensar que han sido conservadas durante el camino evolutivo. Ejemplos de ello son la Interleucina 1 (IL-1) y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) (9).

Entre los efectos biológicos más importantes que controlan las citocinas está el de promover o inhibir proliferación, la quimiotaxis, inducción de cambios morfológicos y fisiológicos en las células. El efecto depende del tipo celular en el que actúan y de la participación de una o varias citocinas. La modulación puede darse por citocinas secretadas o adheridas a membrana celular.

Algunas citocinas sólo provocan que las células pasen del estado de G0 del ciclo celular a la síntesis de DNA y los primeros estados de la mitosis, pero son incapaces de hacer que la célula complete su ciclo (factores de competencia). Otros factores se encargan de completar el ciclo celular (factores de progresión). Algunas de las citocinas más importantes se listan en el cuadro 1 (8).

Factor de Células Tallo (SCF)
Factor de Crecimiento de Nervios (NGF)
Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF)
Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)
Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF)
Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- $\alpha$ )
Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF $\alpha$ )
Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF)
Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos-Macrófagos (GM-CSF)
Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos (M-CSF)
Interferón Gamma (IFN $\gamma$ )
Interleucina 1 (IL-1)
Interleucina 2 (IL-2)
Interleucina 3 (IL-3)
Interleucina 4 (IL-4)
Interleucina 6 (IL-6)

Cuadro 1. Algunas de las citocinas más importantes. Las siglas provienen de sus nombres en inglés.

Las citocinas activan a las células a través de receptores específicos presentes en números reducidos. Los receptores son glicoproteínas con dominios extra, trans e intracelulares acoplados a una o más rutas de señalización.

La clonación de los DNA para los receptores ha permitido dividirlos en 3 familias:

La familia de los receptores de factores de crecimiento hematopoyético, HGFR del Inglés Hematopoietic Growth Factor Receptors. Comprende a los receptores para las interleucinas 3, 5, 6, 7 y el GM-CSF. Esta familia se caracteriza porque sus receptores enlazan sólo una proteína, aunque algunos de ellos requieren de la asociación con otra proteína para aumentar la afinidad y esta subunidad puede ser compartida, por ejemplo, la subunidad  $\alpha$  de los receptores de IL-3 y GM-CSF enlaza con baja afinidad a estas moléculas y es específica para cada uno, mientras que la subunidad  $\beta$  que es compartida por ellos no puede unirlos pero es indispensable para conferir alta afinidad al receptor cuando se integra con la subunidad  $\alpha$  (10). Los receptores poseen cisteínas en el dominio extracelular y una secuencia de 5 aminoácidos constituida por Trip-Ser-X-Trip-Ser próxima al dominio transmembranal. Presentan similitudes en el dominio extracelular, pero diferencias en el citoplásmico. Carecen de actividad cinasa, se piensa que alguna proteína asociada es la encargada de la actividad enzimática. Por lo general presentan formas de alta y baja afinidad (11).

El grupo de los receptores para el Factor de Necrosis Tumoral, TNFR del inglés Tumor Necrosis Factor Receptors, que comprende a los receptores para TNF y NGF. Muestran cadenas de enlace múltiple y ligan múltiples ligandos. Tienen 3 ó 4 arreglos de cisteína conservados de 40 aminoácidos (a.a). Al parecer estos receptores presenta varios sitios de enlace (11).

La familia del super gen de la inmunoglobulina donde se encuentran los receptores de la Interleucina 1, el antagonista de receptor de IL-1 y el receptor de M-CSF. Poseen dominios extracelulares similares a la IgG. Pueden presentar constitución heterogénea al estar integrados por 2 cadenas diferentes, algunos de ellos son identificados como proto-oncogenes y una mutación en ellos los convierte en oncogenes, al tiempo que produce actividad tirosina cinasa ininterrumpida (8).

Cabe señalar que dentro de cada familia se encuentran también receptores para moléculas no consideradas como citocinas y que los receptores para la Interleucina 2 (IL-2r) y el Interferón Gama (IFN $\gamma$ ) no pertenecen a ninguna de las familias (8).

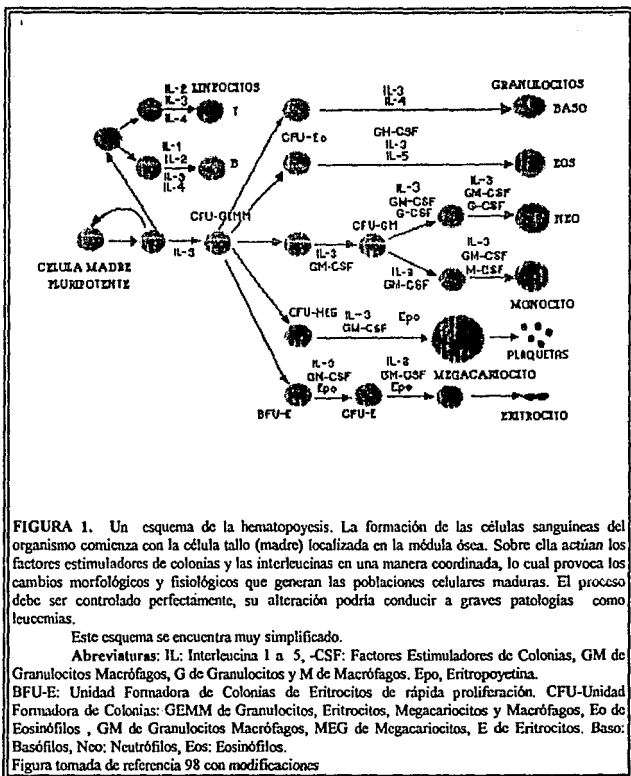
De entre todas las citocinas, merecen mención aparte aquellos factores que controlan el crecimiento hematopoyético y que comprenden al grupo conocido como HGF's del inglés Hematopoietic Growth Factors. A continuación se describen algunas de las características de ellos.

## LA HEMATOPOYESIS Y LOS HGFS

Las células sanguíneas son muy especializadas y a excepción de algunos linfocitos y macrófagos, no permanecen mucho tiempo en circulación, por lo que se tienen que reemplazar a partir de sus progenitores de la médula ósea (12).

La médula ósea es capaz de producir alrededor de  $4 \times 10^{11}$  células cada hora en condiciones normales, e incrementar hasta en un factor de 10 el número cuando se presentan infecciones o sangrados (13, 14). La integridad del sistema es mantenida por una población relativamente pequeña de progenitores denominados células tallo que bien pueden autorrenovarse permaneciendo indiferenciadas o proseguir su diferenciación y desarrollo, disminuyendo así su potencial proliferativo. La capacidad autoproliferativa de las células tallo garantiza que su número se mantenga durante toda la vida (14).

El proceso de formación, proliferación y diferenciación de células sanguíneas a partir de un progenitor denominado célula tallo totipotencial es conocido como HEMATOPOYESIS (Figura 1). La existencia de las células tallo fue intuida por Till y McCulloch en 1961 (15)



gracias a sus experimentos con ratones irradiados en los que se inyectaba médula ósea y se observaba formación de colonias en su bazo, las CFU-S (del inglés Colony Forming Units Spleen) capaces de reconstituir las poblaciones de células sanguíneas.

Otros experimentos importantes que demuestran la existencia de las células tallo son los cultivos *in vitro* desarrollados por Metcalf en 1988 (16), donde las células de médula ósea eran cultivadas sobre una matriz en presencia de los estímulos apropiados originando colonias de



progenitores mixtos. En estos estudios se resalta también la importancia de los factores de crecimiento hematopoyético y de algunas interleucinas, que favorecían el crecimiento de ciertos linajes en particular, permitiendo responder a las preguntas acerca de ¿cómo se da la formación de ciertas células? ¿es un proceso determinado por el microambiente o completamente aleatorio?

McCulloch y Till (15) proponían que el comprometimiento de los progenitores hacia algún linaje celular en particular era un proceso aleatorio, mientras que Curry y Trentin (17) proponían que es en respuesta al ambiente.

Al evaluar la actividad de los diferentes HGF's por separado se determinó que bajo cierto estímulo, las células de la médula ósea mantenían un patrón de diferenciación y autorrenovación específico y que, al cambiar las condiciones, los progenitores podían perder su capacidad de autorrenovarse. De esta forma, quedaba demostrado que la respuesta de las células estaba principalmente en función de los factores presentes y de sus concentraciones. Sin embargo, la proliferación y diferenciación celular también es regulada por la matriz extracelular (colágenos de tipo I, IV, glicosaminoglicanos, fibronectina, laminina) y el estroma (constituido por fibroblastos, endotelio, macrófagos y las células tallo). Estos componentes desempeñan un papel importante, ya que poseen la capacidad de "secuestrar" a los HGF's controlando de esta forma su efecto, creando además, nichos discretos para las células tallo en los que tiene lugar la proliferación y diferenciación, fenómenos que ocurren uno a expensas del otro gracias a la presentación de factores que realizan la matriz y el estroma (12, 14, 18).

A diferencia de otros factores de crecimiento como EGF, PDGF, FGF y NGF, los HGF's son indispensables para la sobrevivencia de las células sobre las que actúan (12, 14, 19).

En base a la acción biológica de los HGF's sobre las poblaciones de células hematopoyéticas en un inicio se habían establecido 5 diferentes compartimentos celulares (19).

- 1) Células tallo autorrenovables
- 2) Células comprometidas a cierto linaje celular
- 3) Compartimentos de proliferación de linajes específicos
- 4) Compartimentos de diferenciación de las células sanguíneas
- 5) Compartimentos de activación para funciones efectoras.

Sin embargo, al avanzar los estudios y observarse que participaban otros elementos en la hematopoyesis se modificaron los compartimentos en cuanto a sus elementos, aunque se siguen considerando sólo 5 (18).

- 1) Microambiente entre células y factores.
- 2) Células tallo autorrenovables y capaces de generar todos los linajes.
- 3) Células progenitoras ya comprometidas con algún linaje en particular, las denominadas unidades formadoras de colonias (CFU del inglés Colony Forming Units).
- 4) Células en el último período de división, maduras ya en circulación o en los tejidos.
- 5) Células accesorias capaces de secretar estimuladores o inhibidores y comprenden linfocitos T, NK, linfocitos granulares grandes, linfocitos B, macrófagos, epitelios y fibroblastos.

En ambos sistemas se señala que los HGF's pueden ser restringidos en sus efectos a un sólo compartimento o participar en varios de ellos.

Por su modo de acción, los HGF's se pueden dividir en 2 grandes grupos:

CSF's del inglés Colony Stimulating Factors de los que se han descrito 4 a la fecha y son GM-CSF, Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos-Macrófagos, G-CSF, Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos, M-CSF, Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos e IL-3, Factor Estimulador de Colonias Multilínea o Interleucina 3. En este grupo también se incluye a la molécula conocida como Eritropoyetina (Epo) y que se caracteriza por promover la proliferación de las células hematopoyéticas de linaje eritroide.

Las Interleucinas de las que se han reportado a la fecha 12 diferentes y para cuya

designación han sido numeradas de la 1 a la 12, no sólo presentan efectos proliferativos, sino también diferenciadores y de activación en las células sobre las que actúan.

Una diferencia más entre ambos grupos es que las interleucinas son secretadas por lo general por macrófagos y linfocitos, mientras que los CSF's son producidos principalmente por células "no hematopoyéticas" como células endoteliales o fibroblásticas (20).

Los cDNA's para los 4 CSF's ya se habían obtenido para 1988, estas formas recombinantes a pesar de carecer de los azúcares presentaron efectos en los ensayos *in vitro* (excepto la Epo) aún cuando se emplearon dosis de nanogramos. El obtener grandes cantidades de las moléculas recombinantes permitió crear anticuerpos específicos para cada una de ellas y de ésta forma determinar efectos particulares, así como también detectar y cuantificar los niveles de sus receptores y descubrir que éstos se encontraban presentes aun en células que en primera instancia no parecen relacionadas con el sistema hematopoyético (21).

A continuación se mencionan algunas características de los 4 CSF's.

**Multi-CSF 6 IL-3:** Factor Estimulador de Colonias Multilínea o Interleucina 3. El peso de la proteína oscila entre 14 y 30 kD (Kilodaltons) según el nivel de glicosilación que presente.

Fue posible caracterizar sus efectos gracias a su secreción por la línea micromonocítica de ratón WEHI-3B, de cuyo medio condicionado (MC) se le purificó (13). IL-3 además de ser producida por la línea WEHI es producida por los linfocitos T (12).

Es el factor de rango de acción más amplio ya que actúa sobre prácticamente todos los progenitores de la línea mielóide primitivos o ya comprometidos hacia cierto linaje, aunque es incapaz de llevarlos a su madurez completa, por lo que se le debe considerar un factor de competencia (20). El gen que codifica para IL-3 está muy cerca del gen de GM-CSF en 5q23.31, por lo que se piensa que tienen un origen común a partir de un gen que sufrió duplicación (13).

La IL-3 tiene actividad especie específica, su homología entre hombre y ratón es de 29% a nivel de a.a., pero se incrementa a nivel de DNA hasta 45%, donde una región del lado 3' es 59% homóloga entre ambos. Se cree que esta región está implicada en la regulación de la transcripción (13).

El receptor para IL-3 está compuesto por 2 subunidades, la subunidad  $\beta$  que le confiere alta afinidad es de 135 kD y es compartida con IL-5 y GM-CSF dándose competencia por ella (22). IL-3 es uno de los factores de más rápida acción junto con GM-CSF (23) y entre sus efectos se encuentran:

Promover la sobrevivencia y proliferación de todos los progenitores de origen mielóide, pero también actúa sobre cosinófilos maduros para incrementar su citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis por complemento, producción de anión superóxido y metabolismo, así como en macrófagos para ejercer respuesta citotóxica tal vez por secreción de TNF. En ratón sinergiza con GM-CSF y M-CSF en la formación de colonias, provoca esplenomegalia (13).

IL-3 induce receptores para GM-CSF de alta afinidad, reduce los receptores de los otros CSF's en médula ósea de ratón. (24).

Dado su amplio espectro de acción es uno de los más fuertes candidatos para emplearse en diferentes padecimientos hematopoyéticos, trasplante de médula ósea y recuperación de pacientes con radio o quimioterapia ya sea sola o combinada con otros factores ya que sinergiza con varios de ellos, excepto con GM-CSF ya que esta molécula la inhibe tal vez por la competencia por la subunidad del receptor que comparten (23). A este respecto se debe considerar que IL-3 también se autorregula negativamente.

Acerca de su mecanismo de acción, para IL-3 y GM-CSF se ha observado que sus efectos son dependientes de ATP, y que si se suministra ATP exógeno las respuestas son similares a las provocadas por IL-3 (19).

**GM-CSF:** Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos-Macrófagos. El GM-CSF fue

purificado a partir del MC de la línea linfoblástica MoT, aunque también es producido por linfocitos T activados, endotelio, fibroblastos y monocitos (12, 13). El peso molecular reportado para la proteína de GM-CSF es de 35 ó 22 kD dependiendo de su glicosilación. Se piensa que sus azúcares al igual que en otros factores ayudan a que se absorba y distribuya en tejido, aunque se ha observado que formas menos glicosiladas parecen ser más activas (25).

El DNA para esta molécula fue obtenido de las células Mo. La localización cromosómica del gen es la banda 5q23-31, muy próximo al de IL-3 (13, 25). La homología entre la proteína humana y la de ratón a nivel de a.a. es de 60%.

Por otra parte, se ha reportado que presenta un receptor de 2 cadenas, una de las cuales es codificada por el gen AIC2B y compartida con IL-3 e IL-5. La expresión de esta subunidad está controlada por el propio GM-CSF y el M-CSF (24).

GM-CSF presenta varios blancos y entre sus efectos se encuentran:

Generar colonias de macrófagos a bajas concentraciones y de granulocitos a altas (23). *In vivo* presenta un efecto similar (26). Por otro lado, puede sinergizar con factores como M-CSF, G-CSF, IL-1 e IL-3 en la formación de colonias.

El GM-CSF sostiene la viabilidad y proliferación de colonias multilíneas o de linaje más restringido, incrementa la capacidad microbicida y tumoricida de granulocitos y monocitos, participa en la secreción de TNF, IL-1 M-CSF. Inhibe migración de neutrófilos tal vez porque incrementa los niveles de la proteína Mol (proteína adherente para granulocitos), induce al receptor para la fracción C3b del complemento, aumenta la ADCC y la muerte celular mediada por el complemento (el aumento de la citotoxicidad contra diversos blancos parece mediado a través de la producción de TNF), hace responsivos a los neutrófilos contra algunos productos químicos y promueve la secreción de anión superóxido (13, 25).

Por otra parte, induce la síntesis de G-CSF y TNF en los macrófagos (26), induce la producción de mRNA para las 2 formas de IL-1 y de M-CSF (las proteínas para IL-1 $\beta$  y M-CSF se detectan a los 2 días mientras que para IL-1 $\alpha$  hasta los 3 días). GM-CSF reduce los niveles de receptores para G-CSF y M-CSF (24).

El GM-CSF sobre endotelios presenta efecto dosis dependiente en la proliferación y migración de estas células a través de un gradiente de concentraciones por lo que tal vez tiene un papel en el proceso de cicatrización de heridas. En estas mismas células presenta un incremento en la expresión del proto-oncogene c-fos (27).

En sus efectos parece no alterar el flujo de calcio ni la actividad de proteína cinasa C. GM-CSF es inhibido por sí mismo y por IL-3 (13). GM-CSF e IL-3 parecen presentar formas ancladas a membrana, se piensa que tal vez éstas presentan diferente actividad respecto a las formas secretadas (25).

El GM-CSF es detectado *in vivo* (12) y se le está empleando en tratamiento de síndromes mielodisplásicos, en trasplante de médula ósea y en la recuperación de pacientes que han sido tratados con quimio o radioterapia (25).

G-CSF: Factor estimulador de Colonias de Granulocitos. El G-CSF fue purificado del MC de la línea fibroblástica 5637, mientras que su cDNA de un carcinoma de células escamosas (CHU-2) y la propia 5637 donde por ser 9 nucleótidos menor, codifica para 3 a.a. menos. Pesa de 18 a 22 kD y es el único factor O glicosilado. No es especie específico, presenta 69% de homología entre ratón y humano en la secuencia de a.a (13, 28).

El gen de la proteína humana se encuentra en el cromosoma 17 en las bandas q11.2 a 2.1, mientras que el gen que codifica para su receptor se encuentra en 1p32-33. El gen para este receptor transcribe 4 formas diferentes de mRNA, uno de ellos genera un receptor en forma soluble (29). Los receptores para G-CSF están presentes en neutrófilos, monocitos, células de médula ósea, leucemias mieloides, endotelio, trofoblastos (30). En el ratón sus receptores se

incrementan conforme la célula madura, lo opuesto ocurre en el humano por lo que se piensa que la acción de este factor puede ser diferente entre ambos organismos (28).

El G-CSF presenta 800 receptores en macrófagos y en endotelios 233-479 (19, 27). La fijación del G-CSF al receptor permite la internalización, degradación y liberación al medio de esta molécula (30).

Este factor es producido por linfocitos T activados, monocitos, células astrogliales (29) endotelios y fibroblastos (12) en respuesta a TNF, IL-1, IL-4, endotoxina y bacterias (13, 26).

Por otra parte, sus acciones son inhibidas por TNF $\alpha$ , IL-3 y GM-CSF que reducen sus receptores (23, 30). Asimismo se presenta una desaparición de receptores transitoria cuando se emplean M y GM-CSF y su recuperación es inhibida por cicloheximida (30).

Entre los efectos del G-CSF se hallan: incrementar la fagocitosis por complemento pero sólo en neutrófilos, potenciar la sobrevivencia y funciones de estas células e incrementar sus formas inmaduras en circulación (26). Reduce los receptores de GM-CSF y M-CSF pero sólo en alta concentración (24). Es quimiotáctico de monocitos. Diferencia las líneas HL-60 y WEHI3D, ayuda a la diferenciación de la línea U-937 por GM-CSF *in vitro* (13, 27, 29, 30). IL-4 e IL-1 sinergizan con él para la formación de colonias de granulocitos macrófagos en humano (26). Induce la migración y proliferación de endotelio. El que se produzca este factor en médula ósea junto con M-CSF por los endotelios y fibroblastos sugiere un papel autócrino en la regulación de la proliferación de estas células (27).

Se le emplea en síndromes mielodisplásicos, recuperación de quimioterapia, trasplante de médula ósea así como en diferenciación de leucemias mieloides agudas de humano (27, 29).

M-CSF: Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos. El M-CSF es el factor de mayor peso molecular. La proteína activa es un homodímero de 70 a 90 kD constituido de 2 cadenas de 45 kD. Los monómeros no son activos (21). Presenta un dominio hidrofóbico que le permite anclarse a la membrana celular, mientras que la forma secretada se da por hidrólisis de esta secuencia. El M-CSF es el más complejo de los CSF's. Su complejidad se da a todos niveles, desde DNA hasta la proteína (13). El factor humano fue purificado en 1984, su gen tiene 10 exones, una longitud de 21 Kb y se localiza en el cromosoma 5q33.1. Solo existe una copia del gen que produce varios mRNA por mecanismos de maduración distintos. Las porciones amino terminales en ratón y humano hacen pensar gracias a su similitud que son importantes en la actividad (31). La cicloheximida inhibe la producción de la proteína, pero estabiliza su mRNA que parece inestable debido a pares AU de su región 3'. De esta forma, con una proteína lábil y estas secuencias en su mRNA la regulación de M-CSF parece darse a nivel trans y posttranscripcional (31).

El M-CSF es el factor que se ha asociado más con padecimientos leucémicos debido a que su receptor de 165 kD es codificado por el protooncogene *c-fms* que también se localiza en el cromosoma 5 (32). En los macrófagos maduros el receptor para este factor se internaliza y recicla en 15 minutos, en formas inmaduras tarda más. El receptor presenta actividad tirosina cinasa (28). El número de receptores para éste factor es muy bajo tanto en células en circulación como en progenitores mieloides.

Los transcritos de M-CSF se producen en hígado, placenta, fibroblastos, epitelios así como en algunos carcinomas de páncreas en humano. En ratón se ha detectado también en pulmón, cerebro, corazón, bazo y útero (31, 32).

El M-CSF es producido por fibroblastos y endotelios constitutivamente y en respuesta a IL-1, TNF e IFN $\gamma$ , mientras que IL-4 lo induce en fibroblastos. Su producción por monocitos y linfocitos T es en respuesta a diferentes estímulos, (12, 13, 25, 26). Sus efectos son controlados también por diferentes mecanismos, por ejemplo; la inducción de síntesis de DNA inducida por este factor es inhibida por IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-4 (33). Los 4 CSF's reducen el

enlace del M-CSF a su receptor (23).

Cuando el M-CSF estimula a los macrófagos, promueve la producción de IL-1 y TNF por estas células, potencia su ADCC y mantiene sus niveles de producción de anión superóxido durante todos los días de cultivo (13, 34).

M-CSF sinergiza con IL-1 en la formación de colonias (26), baja los receptores de GM-CSF y M-CSF pero sólo en alta concentración (24). Por otra parte, induce la expresión de la subunidad de receptor compartida por IL-3 y GM-CSF (24). Induce secreción de IFN $\gamma$  (31). El M-CSF humano actúa débilmente para la proliferación de células ya avanzadas en su diferenciación, mientras que el efecto es mejor en células de ratón (33). También se le emplea en la recuperación de pacientes con cáncer, pero sus resultados son muy limitados (24).

La activación de síntesis de DNA por M-CSF es detenida por la toxina de Pertussi, lo que implica participación de proteínas G (proteína ligadora de nucleótidos de Guanina) en sus mecanismos de señalización al tiempo que activa proteína cinasa C (33).

Como ya se mencionó, ha sido difícil detectar a los CSF's en el suero de personas sanas, entre los primeros en detectarse se encuentra el GM-CSF (1971) (19). Posteriormente se detectó al G-CSF y M-CSF en circulación (28). La dificultad para detectarlos hace suponer que sólo son liberados en el microambiente donde se requieren, o a que son rápidamente retirados del torrente sanguíneo (19).

Las primeras etapas de prueba para la aplicación clínica de los CSF's se están desarrollando con bastantes reservas ya que por ejemplo, se ha observado que GM-CSF en pacientes con leucemia aumenta el número de blastos en circulación, además de presentar efectos colaterales muy severos entre los que se encuentran dolor óseo, flebitis, fiebre, fatiga, náusea, dolor de cabeza, de pecho, artralgia, mialgia, además de ser rápidamente retirado de la circulación. El G-CSF es menos nocivo, pero también es incapaz de madurar completamente a las células de los pacientes, además es mucho más restringido en su acción (21). En vista de estos resultados, se está pensando emplear otras estrategias como aprovechar la capacidad proliferadora de los CSF's para administrarlos; hacer proliferar los clones malignos y volverlos blanco más fácil de radio o quimioterapia, o bien, emplearlos en combinación aprovechando los sinergismos que se presentan entre ellos al tiempo que las dosis usadas se reducirían y con esto los efectos colaterales (21).

Los HGF's no son las únicas moléculas que participan en la hematopoyesis, las Interleucinas son también muy importantes en el balance de los procesos de proliferación y diferenciación, sin embargo; de entre todas las Interleucinas, destaca la Interleucina 1.

## INTERLEUCINA 1

La Interleucina 1 (IL-1) es una glicoproteína de 17.5 kD de la cual existen dos formas denominadas Interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ) que presenta un punto isoeléctrico (pI) de 5 e Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) con pI de 7. Las 2 formas de IL-1 comparten el hecho de presentar más de 50 efectos, algunos desencadenados a concentraciones picomolares. Esta molécula afecta a casi cualquier célula del organismo, por ello modula propiedades inflamatorias, metabólicas, fisiológicas, hematopoyéticas e inmunológicas (35, 36, 37, 38). Por su conservación a lo largo de la evolución, parece que IL-1 es uno de los principales orquestadores de los mecanismos de respuesta adaptativa. Moléculas con actividad de IL-1 han sido aisladas de organismos como anélidos y equinodermos, en los que su principal función es estimular los coelomocitos (denominados también como hemocitos, amebocito o plasmotocito) a la fagocitosis y agregación. Por otra parte, las moléculas de los invertebrados son biológicamente funcionales en células de vertebrados superiores (9, 38).

Originalmente, la IL-1 fue descrita en 1940 como una proteína lábil al calor, aislada de exudados de granulocitos que tenía la capacidad de producir fiebre, por lo que se le llamó Pirógeno Endógeno. Presentaba un peso molecular de entre 10 y 20 kD y pI de 7.2 (37). Para la década de los 70's se le purificó y observó que dosis de nanogramos eran capaces de inducir fiebre, pero también muchos otros efectos como disminución en los niveles plasmáticos de Fe y Zn, neutrofilia, aparición de actividad estimuladora de colonias, potenciación de la síntesis de proteína amiloide hepática A y activación de linfocitos, por lo que se le identificó también como "Factor activador de linfocitos". Posteriormente se observó la homología de este factor con varias sustancias que habían sido descritas por sus efectos, por lo que, para evitar ambigüedades se llegó al acuerdo de designar a todos estos factores con el nombre de INTERLEUCINA 1 (35, 39, 40). Algunos de los nombres con los que se conoció a IL-1 se enlistan en el cuadro 2.

Mediador Endógeno de Leucocitos
Factor de Células Mononucleares
Catabolina
Factor Activador de Osteoclastos
Hemopoyetina-1
Factor de Neutrófilos Promotor de la Proliferación de Linfocitos
Factor Inhibidor del Crecimiento de Melanoma
Factor Inhibidor de Tumores-2

**Cuadro 2.** Algunos nombres de IL-1.

Las 2 formas de IL-1 son producto de genes diferentes que para el humano se encuentran en el cromosoma 2 en 2q13-q21 la IL-1 $\beta$  y en 2q13 IL-1 $\alpha$  (41, 42).

En 1984 Lomedico et al (43) reportan la clonación del DNA de IL-1 $\alpha$  de ratón a partir de la línea macrofágica P388D1 codificando un precursor de 270 a.a., 31 Kd y pI de 5. Por su parte Auron et al (44) ese mismo año clonaron un cDNA a partir de monocitos humanos que codificaba para un precursor de 31 kD de 269 a.a. pero de pI de 7 (IL-1 $\beta$ ). El no detectar a la proteína de 17.5 kD que es la forma activa, indicaba que se debía presentar algún proceso

posterior para dar la forma madura. El segundo gen de IL-1 humano (IL-1 $\alpha$ ) fue aislado por March et al (45) en 1985, mientras que el segundo gen de ratón (IL-1 $\beta$ ) se clonó hasta 1986 por el grupo de Gray et al (46). Al igual que con los 2 genes descritos anteriormente, los cDNAs obtenidos codificaban para una proteína de 31 kD. Estudios posteriores han hecho posible aislar los genes de toros, cerdos, conejos y ratas (35, 36, 37).

El gen de IL-1 $\beta$  es de 7.8 Kb, mientras que el de IL-1 $\alpha$  es de 10.5 Kb. Ambos poseen 7 exones que codifican para la proteína. En el ratón se ha reportado una organización similar para el gen IL-1 $\beta$ . Un hecho sobresaliente es que en la región 3' de los genes se presenta una secuencia repetitiva de 7 nucleótidos, que se piensa le confiere inestabilidad al mRNA al menos que se encuentren presentes endotoxinas bacterianas (LPS), ya que esta secuencia se presenta en otras citocinas sensibles la endotoxina (35, 37, 38).

Ambos genes presentan una gran sensibilidad a LPS, a grado tal que cuando se desea cuantificar transcripción, es necesario seguir procedimientos de purificación del medio y suero que aseguren que en ellos se presentan menos de 10 pg/ml de LPS, aunque algunos estudios indican que se da su activación aún a concentraciones de 5 moléculas de LPS por monocito (35, 47, 48).

La comparación entre especies indica que las formas  $\beta$  de IL-1 presenta mayor homología (75-78%), mientras que la forma  $\alpha$  es menos conservada (60-70%). Sorprendentemente, las 2 formas dentro de una misma especie sólo presentan en promedio 25% de homología (46). En la comparación por secciones, el extremo N terminal de  $\alpha$  es más conservado en los precursores, en cambio en  $\beta$ , el extremo C-terminal de la proteína madura (región de la actividad biológica) es el que se conserva (35, 36, 37).

Gracias a los análisis moleculares, se ha podido proponer que IL-1 $\alpha$  es el ancestro de las 2 formas existentes de este factor mientras  $\beta$  derivó de ella por transcripción inversa (38).

Como ya se mencionó, las 2 formas de IL-1 son sintetizadas como precursores de 31 kD (pro IL-1). El precursor no contiene un péptido señal que pudiera indicar un sitio ordinario de corte para originar el extremo N terminal, lo que hace a IL-1 única entre las citocinas (49). La pro IL-1 es procesada por enzimas que originan la forma carboxi-terminal activa de 17.5 kD llamada proteína "madura" (35, 36, 37).

La pro IL-1 $\alpha$  se fosforila y es parcialmente activa, aunque permanece en el citoplasma hasta 15 hrs. Por su parte, la pro IL-1 $\beta$  solo permanece 2.5 hrs en el citoplasma, es parcialmente activa aún sin fosforilar y es la forma más secretada tanto en el ratón como en el humano. En su secreción participan ionóforos de calcio (49, 50).

El 70% de la IL-1 $\beta$  es secretada por las células mononucleadas de sangre periférica en 24 hrs, mientras que la IL-1 $\alpha$  permanece en la célula durante las primeras 20 hrs asociada a membrana (40).

No se conoce como la IL-1 es transportada del citosol al compartimento extracelular, ni cómo es procesada para originar las formas maduras. La secreción del precursor y su procesamiento parecen ser eventos unidos, sin embargo, algunos estudios sugieren que la pro IL-1 $\beta$  es secretada como tal y procesada al llegar a los sitios de inflamación, ya que la pro IL-1 $\beta$  así como un péptido parcialmente procesado han sido encontrados en los sobrenadantes de monocitos (37). En el procesamiento de la pro IL-1 $\beta$  se han implicado a la Elastasa, plasmina, proteasas de colagenasa y serina, así como una proteasa presente solamente en los monocitos que corta en la alanina de la posición 117. El extremo N-terminal "natural" de la IL-1 $\beta$  es esta alanina, aunque se han reportado formas con otros extremos (35).

Para el procesamiento de pro IL-1 $\alpha$  se involucra a una proteasa neutral activada por calcio conocida como Calpina que la corta para originar la forma secretada activa (35).

Como la producción de mRNA de ambas formas de IL-1 es casi igual a la cantidad de proteína se dice que su producción es regulada principalmente a nivel de transcripción (40).

IL-1 $\beta$  madura se encuentra en la orina, plasma, fluidos peritoneales, pleurales y de las articulaciones. Por otra parte, IL-1 $\alpha$  se mantiene unida a la membrana mediante un enlace tipo lectina. Casi toda la IL-1 asociada a la célula es IL-1 $\alpha$ . La IL-1 $\alpha$  en la membrana puede ser importante si la célula muere, ya que se libera y desencadena respuesta en otras células (51). IL-1 $\alpha$  también puede estar unida a la superficie celular vía su receptor (35). Cuando se cuantifica el efecto biológico de las células con IL-1 en la membrana, se debe ser cuidadoso con el procedimiento de fijación, ya que el tratamiento puede liberar a la molécula. No se conoce cual es la orientación de la molécula de IL-1 en la membrana celular que le permite acoplarse a su receptor y ejercer sus efectos.

Con la finalidad de conocer la estructura tridimensional de IL-1, así como las secuencias de a.a. que le permiten acoplarse a su receptor y desencadenar sus efectos, se han realizado estudios donde se han creado péptidos sintéticos de IL-1, usado anticuerpos, insertado mutaciones en el DNA y cristalografía de rayos X en esta molécula. En estas investigaciones, se ha observado que aún cuando los péptidos sintéticos se unen al receptor, en ocasiones no desencadenan respuesta, desencadenan solo algunas, o bien lo hacen en forma débil lo que implica que las actividades de IL-1 se encuentran distribuidas en diferentes regiones. Al conjugar los estudios empleando los péptidos con los estudios donde se usan anticuerpos y aquellos donde se insertan mutaciones, se ha determinado que posiciones importantes para la estructura y actividad de IL-1 son: Arginina 120, histidina 146, los a.a. de la posición 163-186, 208-269 y sus 2 cisteínas (35, 36).

Con respecto a la estructura tridimensional, los estudios revelan que IL-1 posee 12 pliegues  $\beta$  unidos por puentes de hidrógeno y que es similar a un tetraedro cuyo interior se encuentra lleno por las cadenas hidrofóbicas de los a.a. excepto por grandes porciones de la cadena lateral del ácido glutámico que parece ser muy importante para la actividad. Presenta también un bucle entre las hojas  $\beta$  plegadas gracias a los a.a. de la posición 163-171 (37).

## RECEPTORES DE IL-1

Se han descrito 2 moléculas como los receptores de IL-1 y se les ha denominado como IL-1RI e IL-1RII:

**IL-1RI:** Receptor de Interleucina 1 tipo I. Es miembro de la superfamilia de las IgG, con una vida media de 12 hrs. Se encuentra en fibroblastos, queratinocitos, endotelio, células sinoviales, condrocitos, hepatocitos, células T CD4 pero no CD8, monocitos (52, 53).

Este receptor fue purificado por Urdal et al (54), mientras que Sims et al (55), describió las regiones que lo forman: una región extracelular de 391 a.a. y que posee 3 dominios del tipo IgG con varios sitios posibles de glicosilación, la región transmembranal de 21 a.a. y la citoplásmica de 217 a.a. que no posee homología con ninguna proteína cinasa conocida, pero cuyos residuos serina-treonina son fosforilados tan pronto como se acopla a su ligando (35, 55).

La IL-1 unida este receptor es internalizada en un 60 a 70% dentro de los primeros 5 minutos, no se degrada y se le halla en el núcleo horas después, lo cual implica que existe algún sitio de reconocimiento de IL-1 en el núcleo para su actividad biológica. Sin embargo, algunas de las respuestas mediadas a través de este receptor como cambios en el metabolismo del ácido araquidónico se dan en unos cuantos minutos, por lo que deben ser distintas en su mecanismo de activación por IL-1 respecto a los mecanismos de control nuclear. Sólo se necesita una mínima ocupación de los receptores para provocar la respuesta (56).



La expresión del IL-1RI es controlada por la propia IL-1. Cuando se cultivan células en presencia del factor a concentraciones que no ocupan más del 10% de los receptores presentes, sus números descienden entre 60% y 80% durante 24 hrs manteniéndose el efecto durante 72 hrs, debido a una disminución en el tiempo de vida medio de su mRNA de 8 hrs a 1 hr. Otro regulador negativo es el TGF $\beta$ . Efectos positivos en la expresión del IL-1RI son dados por IL-2,  $\alpha$ -esteres de forbol, PDGF y prostaglandinas (35, 36, 56).

**IL-1RII: Receptor de Interleucina 1 tipo II.** Se localiza en células y líneas de células B transformadas así como en neutrófilos y células de médula ósea. Con un peso de 68 kD, su región extracelular presenta sólo 28% de homología con el receptor I, un mayor parecido transmembranaral, pero una gran diferencia en la región citoplasmática, ya que la suya es más corta, lo que reduce su peso y provoca que su traducción de señales sea diferente. Se piensa que es también un miembro de la superfamilia IgG, aunque algunos estudios parecen indicar que no posee los típicos dominios extracelulares de las moléculas de esta familia (56). El IL-1RII es pobremente internalizado y posteriormente su ligando es localizado en el núcleo (2-3 hrs). Su número por célula es de 200-1200 (38). Tiene una vida media de 2 hrs (35).

IL-1 incrementa la expresión del IL-1RII en linfocitos B, Fibroblastos y células de médula ósea maduras (57). El G-CSF, GM-CSF, IL-3 e IL-6 aumentan su expresión en células mononucleadas de médula ósea (57). Los FGF's incrementan estos receptores para IL-1 en fibroblastos después de 2 horas, sin cambiar su afinidad (37).

A partir de los estudios en el suero, en sobrenadantes de células mononucleadas de sangre periférica, en exudados de células sinoviales y en medio condicionado de la línea de células B Raji, se ha encontrado una molécula que enlaza a IL-1 $\beta$  así como su precursor, pero no a la IL-1 $\alpha$ . La molécula pesa 47 kD y dado que no se detecta su liberación cuando se añaden inhibidores de proteasas de serina a las Raji, se piensa que es un derivado proteolítico del receptor II y que puede servir como regulador de la actividad de la IL-1 $\beta$  *in vivo* (58).

Los receptores de IL-1 de las células en circulación parecen ser de baja afinidad ya que su constante ( $K_a$ ) es de  $10^9$  ó  $10^{10}$  M $^{-1}$  mientras que los de células fibroblásticas son de alta afinidad, con una  $K_a$  de  $10^{12}$  ó  $10^{13}$  M $^{-1}$  aunque no se ha demostrado que la diferente afinidad confiera diferente respuesta (59).

Aún cuando se dice que ambos receptores pueden unir a las 2 formas de IL-1 de igual manera, hay gran evidencia que indica que dependiendo del tipo celular y especie animal, se presentan diferentes sitios de unión y "preferencias", así como diferente inducción de respuesta. Por lo general, IL-1 $\alpha$  se une mejor al receptor I, mientras que  $\beta$  al II. Por otra parte, anticuerpos contra el receptor I inhiben preferentemente el enlace de  $\beta$ , lo que sugiere que se presentan sitios de unión diferentes para las 2 formas de IL-1 dentro de un mismo receptor (35). Con respecto a los efectos, IL-1 $\beta$  es 30 veces más potente que  $\alpha$  para reducir el número de los receptores de la hormona luteinizante (LHR). IL-1 $\beta$  es más potente en sus efectos sobre cerebro, páncreas, células de la granulosa, células Leydig y en sus propiedades inmunomodulatorias que IL-1 $\alpha$  (58).

Respecto a la transducción de señales mediada por los receptores existen reportes contradictorios (60). El equipo de Mizel et al (61) indica que la señalización a través de IL-1 involucra 4 elementos importantes:

- Una proteína enlazadora de GTP unida al IL-1R, ya que los efectos son inhibidos si se emplea toxina de Pertussi
- AMP cíclico (cAMP) ya que éste y sus análogos mimetizan algunos de los efectos de IL-1, además de que la propia IL-1 induce una elevación transitoria en los niveles de cAMP cuando induce al receptor de IL-2.
- La proteína cinasa A que activa al factor nuclear NF $\kappa$ B

- El factor nuclear NF $\kappa$ B que se enlaza a elementos potenciadores de varios genes inmunomoduladores.

Mizel propone que puede haber variaciones sobre este modelo de respuesta dependiendo del tipo celular, por ejemplo, el receptor puede acoplarse a una proteína G no sensitiva a toxina de Pertussi y activar factores nucleares diferentes, así como también usar otros segundos mensajeros en vez de cAMP, ya que concentraciones elevadas de esta molécula son inhibitorias.

Por otra parte, el equipo de O'Neill (62) se encuentra en completo desacuerdo ya que señala que han detectado cambios en actividad de proteínas cinasas involucrando fosforilación de serina, pero donde no participan ni la proteína cinasa C ni la A, ya que no se han hallado incrementos en los niveles de cAMP o diacil glicerol (DAG), aunque sí cambios en las concentraciones de Na e H y la participación de una proteína tipo G, pero poco sensible a la toxina de Pertussi. Con estos hallazgos, proponen que la IL-1 señala a través de un sistema de proteínas cinasas desconocido hasta ahora, hecho que proponen "no sería extraño dada la unicidad de IL-1 en la naturaleza".

### FUENTES Y ESTIMULO DE PRODUCCION DE IL-1

Originalmente se describió a IL-1 como un producto de los macrófagos activados de diferentes tejidos como pulmón, peritoneales, sangre periférica, bazo, médula ósea y microglia. Sin embargo, los monocitos que maduran *in vivo* pierden su capacidad de producirla (35, 37). La producción de IL-1 por parte de los monocitos depende de la hora del día, contenido de grasa en la dieta, consumo de inhibidores de la ciclooxigenasa, antihistamínicos, corticosteroides y otros agentes, así como del tipo de macrófago ya que se ha observado que por ejemplo, los macrófagos de pulmón secretan menos IL-1 que los monocitos de sangre periférica y esto parece deberse a que sintetizan mRNA para este factor en menor cantidad (1).

Otras fuentes de IL-1 son: queratinocitos, células gliales, linfocitos B normales y transformados, células NK, linfocitos granulares grandes, endotelio, neutrófilos, astrocitos, músculo liso, fibroblastos, células sinoviales, células dendríticas de piel, epitelios de encía, intestinales y cervicales, células de nódulos linfáticos y placenta (38, 40). De entre los linfocitos T, las células de memoria CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> fueron las únicas capaces de producir IL-1 $\alpha$  y se piensa que la producción de IL-1 por estas células podría conducir a un menor umbral de estimulación por las células presentadoras de antígeno (63).

El circuito de producción que sigue IL-1 comienza con su secreción por macrófagos, su llegada a fibroblastos donde promueve la secreción de GM-CSF y M-CSF que a su vez actúan sobre los progenitores de macrófagos que una vez maduros, secretarán la IL-1 en respuesta a varios estímulos (20).

Con excepción de queratinocitos de piel, células epiteliales y algunos componentes del sistema nervioso, IL-1 no es observada en ningún otro tipo celular en individuos sanos, por ejemplo; los fibroblastos de pulmón sólo la secretan si reciben IL-1 exógena (1, 35, 37). Sin embargo, se presenta un gran aumento en su producción en respuesta a infección, toxinas bacterianas, agentes inflamatorios, productos de linfocitos activados y en algunos estados patológicos como leucemias mieloides agudas (64).

IL-1 es detectada en células del sistema nervioso central, donde se cree actúa a nivel de los órganos circunventriculares donde la barrera de sangre se interrumpe (65), sin embargo; se mantiene la duda de si estas moléculas son activas, al igual que en el endotelio del cordón umbilical, donde se piensa que es inducida por el stress del parto. Así pues, en el humano no se

ha podido determinar el papel de la IL-1 en el estado sano, excepto para la hematopoyesis, donde el efecto de IL-1 se da al estimular a las células del estroma a secretar los CSF's e IL-6 (40).

Los LPS son los inductores por excelencia de la producción de IL-1. Bajo condiciones libres de LPS, la síntesis "espontánea" de IL-1 por parte de diferentes células no se presenta. Empleando la endotoxina, la expresión de mRNA es detectable dentro de 15 min, alcanza un máximo a las 8 hrs y desciende rápidamente (37, 40).

Si IL-1 estimula su propia producción, ésta es más lenta, pero se sostiene por 30 hrs (40).

IL-3 produce muy poca síntesis de RNA de IL-1 $\beta$  que se sostiene sólo durante 80 minutos, en consecuencia es muy poca la cantidad de proteína liberada al medio. Al combinar IL-3 con M-CSF, el efecto sobre el mRNA se prolonga por 4 hrs tal vez porque IL-3 aumenta los receptores para M-CSF favoreciendo su efecto (66).

Por su parte, el GM-CSF aumenta 6 veces el nivel de mRNA de IL-1 $\beta$ , mientras que M-CSF sólo 2 veces. Ambos factores aumentan la actividad del factor nuclear NF $\kappa$ B que como ya se mencionó, se cree está involucrado en la ruta de señales de transducción de IL-1 (66). Otros estímulos para la producción de IL-1 son bacterias Gramm positivas, virus vivos de doble cadena de RNA, componentes del complemento, sales biliares, lectina, TNF- $\alpha$ , IL-2 e IFN $\gamma$  éste último siempre y cuando estén presentes LPS o TNF, ya que si no se da esa condición, se inhibe su transcripción (38, 67).

IL-1 puede ser inducida en macrófagos por adherencia, Forbol miristato acetato (PMA), partículas de látex, sílica gel o contacto con linfocitos T via complejo mayor de histocompatibilidad clase Ia (MHC-Ia) (40, 66, 68).

Diferentes fracciones del complemento fueron incapaces de generar liberación de IL-1 excepto C3b combinada con endotoxina y en presencia del receptor para LPS (67, 69).

Por otra parte, entre los inhibidores de la actividad de IL-1 se encuentran: la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), la Timosina fracción 5 y el mitógeno concanavalina A (ConA) (70). El cAMP suprime los efectos de la IL-1 dependiendo del estímulo y la célula donde se produzca. Los glucocorticoides, IL-4, IL-6, IL-10 y TGF- $\beta$  también suprimen a IL-1. Los corticosteroides la inhiben si se añaden antes del inicio de la transcripción. Los agentes que inhiben en forma inespecífica la ruta del metabolismo de araquidonato también inhiben a IL-1 (38). Si se trata a los macrófagos con anticuerpos anti MHC-Ia, la producción de IL-1 se ve inhibida (68).

El TGF $\beta$  inhibe la expresión de mRNA de IL-1 $\beta$  en un clon leucémico y con ello detiene la diferenciación de estas células inducida por IL-1 (71).

La producción y supresión de IL-1 en monocitos es controlada a nivel trans y posttranscripcional, así como por la internalización de su receptor (38). Después de la adherencia de estas células a su exposición a ciertos elementos del complemento o ionóforos de Ca<sup>2+</sup>, se puede detectar transcripción, pero no traducción aún cuando el mRNA no es destruido. Las células que contienen este mRNA se encuentran "sensibles" y cualquier otro estímulo desencadena una rápida traducción (38).

## EFFECTOS DE IL-1

Como ya se mencionó, la IL-1 es un factor muy pleiotrópico, con una enorme cantidad de efectos biológicos, algunos de ellos contradictorios y que en ocasiones son mediados a través de la liberación de otras citocinas como IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y los CSF's. A continuación se describen algunos de los efectos de IL-1.

## Efectos en la producción de otras moléculas

IL-1 incrementa la síntesis de proteínas patológicas, fibrinógeno, componentes del complemento, factor B, metaloproteínas, factores de coagulación. En el hígado incrementa la síntesis de proteínas de shock térmico y de moléculas "barredoras" de O<sub>2</sub> así como ácidos grasos. Aumenta la síntesis de tiroglobulina y peroxidasa de tiroideas, pero inhibe liberación de hormona tiroidea inducida por prolactina. Inhibe la síntesis de gonadotropina coriónica inducida por testosterona en humanos, incrementa síntesis de esteroides por la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), genera liberación de neuropéptidos, vasopresina, somatostatina así como de ACTH (35).

IL-1 exógena promueve glicólisis en el cerebro, incrementa la síntesis de transportadores de glucosas, mata a las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans al activar la síntesis de proteínas apoptóticas. Si hay baja concentración de azúcar en el organismo estimula la síntesis de preproinsulina, si la concentración es alta, la inhibe (35, 37). Provoca secreción de sodio, induce producción de superóxido, activa metabolismo de ácido araquidónico, incrementa expresión de moléculas de adhesión en endotelio (ICAM-1) y del inhibidor del activador de plasminógeno, del factor de von Willebrand y de PDGF. Incrementa metaloproteinasas y proteoglicanas de condrocitos. Incrementa síntesis de PGE<sub>2</sub> en diferentes células (72). IL-1 estimula la liberación de diacilglicerol o fosfolina sin afectar el cambio de fosfoinositol, provoca la liberación de proteasas (52).

La IL-1 antagoniza con la fosfatasa alcalina para producir vitamina D. Provoca la secreción de aldehído deshidrogenasa protegiendo los precursores hematopoyéticos de la 4 Hidroxiperoxociclofosfamida C (73) Provoca liberación de histamina por basófilos y la degranulación de eosinófilos (35, 37).

Interleucina 1 reduce la síntesis de aldosterona alterando su mRNA, favorece la degradación del mRNA para el IL-1RI. Incrementa la transcripción del protooncogén c-abl, de los genes JE y KC que son genes inducidos por el PDGF al desarrollar sus efectos, induce los factores nucleares NF $\kappa$ B y AP-1. Incrementa la transcripción de las colágenas tipo I, III y IV. Genera inhibición de la expresión del gen de albúmina en hepatocitos. Inhibe la expresión de los genes de citocromo P450, aromatasa y lipasa lipoproteica (35, 37).

La IL-1 incrementa su propia expresión así como las de G-CSF, GM-CSF, IL-6, PDGFAA e IL-8 a nivel de mRNA dándoles una estabilidad 50 veces mayor (57, 72). IL-1 incrementa la transcripción de mRNA de la subunidad  $\alpha$  de los receptores para GM-CSF de 6 a 8 veces y también lo estabiliza (74). Aumenta el receptor de IL-2 de baja afinidad, al tiempo que aumenta su transcripción y lo estabiliza controlando activación y proliferación de linfocitos (74, 75).

Interleucina 1 sinergiza con M-CSF e IL-3 en la recuperación de ratones irradiados y formación de colonias incrementando el número de receptores para los factores. IL-1 estimula liberación *in vitro* de CSF's por parte de células endoteliales, fibroblastos, macrófagos, linfocitos T, aumentando sus niveles en ratón después de su inoculación, sinergiza con ellos en proliferación de células tallo. IL-1 $\alpha$  potencia la sobrevivencia de precursores de granulocitos y macrófagos (76, 77, 78). Induce diferenciación de algunos clones leucémicos particularmente de leucemias mieloides a granulocitos sola o combinada con GM-CSF, dándose sinergismo para este efecto en concentraciones bajas (71). Actúa como cofactor de anti-CD3 para la secreción de IL-2 (52). Sinergiza con IL-6 en la proliferación de linfocitos T y con TNF- $\alpha$  en la protección de ratones contra endotoxina (38).

Interleucina 1 activa células B en conjunción con IL-4, activa linfocitos T, coestimula su proliferación en respuesta a diversos mitógenos (79). IL-1 necesita tratamiento conjunto con IL-3 para provocar mejor formación de eosinófilos (78). Sinergiza con los 4 CSF's y EPO en la

proliferación de los linajes mieloides (79). Si se le combina con TNF inhibe la proliferación de células sanguíneas. La producción de GM-CSF por el timo depende de la IL-1 (70).

IL-1 genera descenso en sus receptores tipo I al enlazarlos aún cuando no se encuentre en exceso hasta en 1/6 de su nivel original (80), provoca también un descenso en el número de receptores de TNF, al tiempo que incrementa la expresión de los receptores de TGF $\beta$ . Provoca descenso en los sitios de unión para PDGFBB y PDGFAA, aunque el descenso en la expresión de los receptores para este último factor se revierte a 72 hrs (72). Inhibe enlace de anticuerpos (abs) al complejo CD4, baja la afinidad del receptor de EGF, inhibe formación del receptor de LH. Incrementa el enlace de opiados a su receptor en el cerebro (35).

Inhibe el incremento de MHC-DR en astrocitos tratados con IFN $\gamma$ , así como en fibroblastos de piel normales y piel de enfermos psoriáticos, de hecho; el efecto de los LPS en reducir MHC está mediado por IL-1 (74).

### Efectos Proliferativos

Interleucina 1 induce la proliferación de fibroblastos, músculo liso, células mesenquiales, endotelio y de células hematopoyéticas linfoides. IL-1 posee la capacidad de mediar destrucción o reparación de tejido mesenquimal (72). Provoca proliferación de CD4 en respuesta a la expresión del receptor para inmunoglobulina E tipo II (81). Incrementa la proliferación de epitelio tímico, aunque también controla la apoptosis mediada por el receptor de células T.

IL-1 regula los ciclos de proliferación y sobrevivencia de los progenitores hematopoyéticos. Sinergiza con TNF para la producción de PGE $_2$  en fibroblastos inhibiendo la mitosis (1).

### Otros efectos de IL-1

La IL-1 es mediador de la respuesta de fase aguda y la respuesta inmune contra un reto antigénico (40).

IL-1 es más efectiva para proteger a ratones granulocitopénicos de infección por *Pseudomonas aureoginosa* que IL-6. Aún combinadas a diferentes dosis no se presenta sinergismo entre ambas, por el contrario, se presenta un ligero antagonismo, de lo cual se deduce que la protección conferida por IL-1 ante infecciones bacterianas no es mediada por IL-6 y que en esta situación la producción de IL-6 es independiente de IL-1 (82, 83).

En pacientes con sarcoidosis y fibrosis pulmonar espontánea se generan cantidades elevadas de IL-1 lo cual se asocia a inflamación (1).

En las articulaciones, IL-1 genera degradación de tipo artrítica, resorción de la matriz de médula ósea y de hueso (52), ya que induce secreción de metaloproteasas por condrocitos, que degradan al cartilago, su acción se ve favorecida por los FGFs (59). Participa en arterioesclerosis y neovascularización (52). Protege a los progenitores hematopoyéticos de agentes tóxicos (73).

IL-1 se detecta en plasma después de ejercicio extenuante y de la ovulación, así como en el rechazo a trasplante de riñón, hepatitis alcohólica, quemaduras, sepsis, después de tratamiento con UV contra psoriasis, en pacientes con hemodíalisis, artritis, en líquido cefaloraquídeo después de meningitis y en los fluidos peritoneal, gingival, nasal, ocular y de oído medio (35, 52).

La IL-1 también es producida en leucemia mielode aguda (AML), en pacientes con enfermedad Hodsking, leucemias de linfocitos T y otras leucemias donde se le atribuye papel en la proliferación de los clones malignos en forma directa o a través de secreción de otros CSF's como G-CSF y GM-CSF (64, 84).

IL-1 + IL-6 recobran a los pacientes del tratamiento con ciclofosfamida y ayuda a proteger a los progenitores mieloides de agentes químicos (40, 73). IL-1 juega un papel muy importante en la inflamación de pacientes con artritis mientras que por otra parte, sus niveles son bajos en pacientes con cáncer metastásico (40).

Administrada en humanos por vía intravenosa provoca fiebre, anorexia, mialgias, altralgias, dolor de cabeza, malestares estomacales, sueño, liberación de ACTH, hipotensión, fibrosis, ruptura de la matriz celular, migración de células inflamatorias, estimulación de células tallo hematopoyéticas aumentando las formas inmaduras de granulocitos en circulación seguida por leucopenia, aumenta la resistencia a infecciones es radioprotectiva, baja la resistencia vascular, reduce las funciones del miocardio, genera acidosis láctica, congestión pulmonar, provoca bajas en los niveles de  $Fe^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ , así como un balance negativo de  $N_2$  por proteólisis y disminuye la síntesis de albúmina (35, 36, 37). A bajas dosis favorece espermatogénesis, a alta la inhibe, también inhibe la contracción de músculo liso vascular e infiltración tisular de neutrófilos. Es por esta razón por lo que no se suministran dosis mayores de 300 ng/Kg. Si se suministra por vía subcutánea los efectos descienden, al igual que si se aplica una sola dosis de alta concentración en lugar de varias dosis pequeñas (37).

En humano, IL-1 es más tóxica que en ratón, pero dada su potencialidad sobre la hematopoyesis, tal vez podría ser empleada con una molécula que incrementa sus receptores para disminuir las dosis óptimas o bien en combinación con otros factores a bajas dosis (38, 57, 71).

## CONTROL DE IL-1

Dada la enorme cantidad de efectos generados por la IL-1, el organismo ha desarrollado diversas maneras de mantenerla bajo control. IL-1 puede ser regulada a nivel de síntesis, transcripción, traducción y secreción. Para el organismo podría ser importante bloquearla después de sintetizada impidiéndole interactuar con los blancos a los que está destinada.

De todos los mecanismos que controlan la actividad de IL-1, tal vez el más importante sea el que está a cargo del Antagonista del Receptor de IL-1 (IL-1ra).

El IL-1ra fue conocido originalmente como "inhibidor de IL-1". Es una proteína que fue purificada de la orina de pacientes con leucemia monocítica con un peso de 23-26 kD. Se observó que bloqueaba el enlace de IL-1 a su receptor en forma específica y que no enlazaba a la IL-1 para suprimir sus efectos (35). Purificándolo de monocitos adherentes y de la línea U-937, su secuencia pudo obtenerse gracias al trabajo de Eisenberg y su equipo (85) quienes construyeron el cDNA de una proteína de 152 a.a., con peso predicho de 17.115 kD, pI de 5.2, un sitio de N glicosilación y homología limitada con ambas formas de IL-1. Se le clonó y expresó en *E. coli*. La proteína obtenida inhibía el efecto de IL-1 sobre los fibroblastos.

EL IL-1ra se une con una afinidad similar a las 2 formas de IL-1 al receptor, por lo que se conoció también como IL-1 Receptor Antagonist Protein (IRAP). Presenta 19% de homología con IL-1 $\alpha$  y 26% con IL-1 $\beta$ , las regiones similares entre las interleucinas, pero diferentes con el IL-1ra pueden ser importantes para el efecto y éstas son las posiciones 120, 124, 125, 127, 146 y 150 (35, 85). Su forma recombinante bloquea de forma igual los efectos de IL-1 tanto *in vitro* e *in vivo* a pesar de carecer de azúcares. Sin embargo, al parecer el bloqueo es mejor sobre el IL-1RI, aunque otros reportes señalan que esto puede ser diferente entre especies (85).

Dado su modo de acción y la homología de secuencias con IL-1, se decidió cambiarle el nombre de IRAP por el de IL-1ra. El IL-1ra previene muchos de los efectos colaterales generados por la administración de IL-1 si se aplica antes que el factor, mientras que también detiene la proliferación de leucemias al parecer inhibiendo la secreción de CSF's mediada por IL-1 y generando una señal de muerte irreversible aún cuando se le retire del cultivo. Para el bloqueo de efectos, las dosis de IL-1ra puede variar (84).

Otras moléculas capaces de inhibir los efectos de IL-1 son las proteínas de envoltura de retrovirus, el factor estimulador de melanocitos alfa, TGF $\beta$ , IFN $\gamma$ , la somatostatina, factor liberador de tiroides, factor liberador de corticotropinas, el dipéptido de muramil metil éster, la uromodulina (detectada en orina de embarazadas), la macroglobulina Hx2M (que es la proteína plasmática que más enlaza a IL-1) (35, 86), algunas lipoproteínas, lípidos y el factor de 52 a 66 kD presente en el medio de la P388, así como IgG anti IL-1 $\alpha$  producida por el propio organismo (87). Sin embargo; ninguna de estas sustancias inhibe el efecto de IL-1 bloqueando su unión al receptor, aunque el TGF $\beta$  baja el número de los receptores presente sobre las células.

Además de las moléculas generadas por el organismo para controlar a IL-1, se han creado anticuerpos contra el IL-1RI que han sido capaces de bloquear en gran medida algunos de sus efectos, pero fallando completamente en otros por lo que otra estrategia para regular los efectos de IL-1 fue crear en forma recombinante al IL-1RI ya que no se han encontrado formas solubles naturalmente a diferencia de lo que ocurre con IL-2 o TNF. A pesar de ello, al suministrarlo se han podido evitar algunos de los efectos de IL-1, pero no se sabe que tanto de ello es atribuible a un descenso de la inflamación mas que a un descenso de inmunoresponsividad (35).

Para finalizar la sección de los factores que participan en los procesos de diferenciación de las células sanguíneas se describirá a otra molécula que no se cataloga dentro de los CSFs o las Interleucinas ni participa directamente en el proceso de hematopoyesis, pero que es capaz de activar y potenciar muchas de las funciones defensivas de los leucocitos, el Interferón Gamma (IFN $\gamma$ ).

## INTERFERON GAMMA

Los interferones (IFN's) son elaborados por las células en respuesta a virus, antígenos o mitógenos. Inducen el llamado estado antiviral, pero a partir de su descubrimiento por Issacs y Lindenmann en 1957 se les han atribuido otras funciones como factores inmunomoduladores, supresores de proliferación y diferenciadores (88). Debido a sus características se les ha dividido en 2 grandes grupos:

- IFN's tipo I, que comprenden las formas  $\alpha$  y  $\beta$  de estas moléculas.

- IFN tipo II o IFN inmune que es la forma  $\gamma$ . Para los propósitos de este trabajo, nos centraremos más en este factor.

El IFN $\gamma$  presenta un solo gen que para el humano se encuentra en el cromosoma 12, mientras que en el ratón se presenta en el cromosoma 16 (8). La secuencia de IFN $\gamma$  es aproximadamente 12% homóloga a la del IFN $\alpha$ . La proteína madura es de 146 a.a. de longitud, no presenta cisteínas, por lo tanto es incapaz de formar puentes disulfuro, es glicosilada. En la molécula humana los residuos Asp-Pro en las posiciones 2 y 3 lo hacen lábil al ácido, a pH 2.3 la proteína se rompe en esa posición perdiendo por completo su actividad antiviral. La pérdida de a.a. 19 del extremo carboxilo terminal reduce su actividad hasta 1000 veces (88). El IFN $\gamma$  es sintetizado en respuesta a mitógenos, antígenos e IL-2. El IFN $\gamma$ , es secretado por linfocitos CD4 $^+$ , CD8 $^+$ , NK, y al parecer *in vitro* los macrófagos alveolares de humano lo secretan. Una vez que las células son estimuladas, la proteína es detectada a las 6 hrs (en macrófagos de sangre periférica, se necesitan 12-72 hrs), alcanza el máximo entre las 48-72 hrs y su producción se puede mantener durante 8 días (88).

El receptor para IFN $\gamma$  presenta una constante de disociación de 10-100 pM, su número es de aprox. 1000 en células normales, que es una cantidad mucho menor que el número de receptores que se presentan para hormonas como insulina o factores de crecimiento como el

EGF aunque en las células tumorales se presenta un número mayor. El gen que codifica para el receptor esta localizado en el cromosoma 6 (8).

El receptor pesa 90 kD y une al interferón como dímero, requiere de un factor especie específico (8). Los receptores se reciclan en U-937 y HL-60, donde su número oscila entre 4-8 mil/célula (28).

Poco se sabe acerca de los mecanismos para desencadenar la respuesta, pero se ha observado que el enlace al receptor no es suficiente, se piensa que debe compartir algunas características con los otros IFN's, aunque debe presentar también mecanismos propios. A este respecto se ha observado que para ejercer su efecto, IFN $\gamma$  necesita de la síntesis de proteína, mientras que IFN $\alpha$  y  $\beta$  no. Su ruta de señalización parece incluir proteínas G, adenilato ciclasa, aumento de AMP cíclico, iones calcio, proteína cinasa C e intercambios de Na e H (89).

Las acciones de IFN $\gamma$  son controladas por IFN $\alpha$ , que lo inhibe, por su parte, el GM-CSF reduce los niveles de receptores para IFN $\gamma$  pero no afecta los niveles de su mRNA (90, 91).

Entre sus efectos se encuentran: incrementa moléculas MHC clase I y II, incrementa la expresión de receptores para inmunoglobulina G tipos I y III en monocitos-macrófagos y polimorfonucleares (PMN), efectos que comparte con los otros 2 IFN's, pero es mucho más efectivo que ellos (89, 90, 92). IFN $\gamma$  media algunas respuestas a través de su inducción de los receptores Fc entre las que se encuentran incluidas la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (del inglés Antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC), fagocitosis, secreción de enzimas lisosomales, producción de anión superóxido. En los PMN sinérgica con TNF, GM-CSF y la linfotóxina para estos efectos siempre y cuando los PMN sean cultivados primero con IFN $\gamma$  y después con los otros factores. (92). Vuelve a los PMN capaces de fagocitar *C. albicans*, efecto que es dependiente de la síntesis *de novo* de proteínas (92).

El IFN $\gamma$  estimula a las células asesinas naturales (NK) en sus funciones, aunque es más lento que el IFN $\alpha$  ya que le toma horas en vez de minutos. Estimula a linfocitos T, aumenta la inmunogenicidad a la vacuna. Incrementa la producción de anticuerpos por linfocitos B. Induce la diferenciación de leucemia de linfocitos B y genera la señal citotóxica para los linfocitos (88). El IFN $\gamma$  es el activador por excelencia de los macrófagos ya que controla su capacidad tumoricida *in vivo*, presentadora de antígenos, degradación de triptófano extracelular, fagocitosis y producción de citocinas, así como su capacidad defensiva contra patógenos como helmintos, protozoarios, bacterias, clamidias y rickettsias de diferentes especies. Se necesita que los macrófagos expresen moléculas del MHC para que la respuesta inmuno sea efectiva, y el IFN $\gamma$  incrementa los niveles de estos antígenos en todos los monocitos humanos, mientras que en ratón solo se presenta el efecto en algunas subpoblaciones. Por otra parte, el IFN $\gamma$  provoca que los macrófagos sean incapaces de fagocitar zymosan opsonizado. (28, 88, 89, 93). Las poblaciones de macrófagos activados por IFN $\gamma$  fagocitan menos parásitos intracelulares, por lo que los macrófagos activados se hacen resistentes a la infección (94).

Los macrófagos activados con IFN $\gamma$  matan *H. capsulatum*, aunque la respuesta de sus poblaciones es diferente (95).

El IFN $\gamma$  es capaz de diferenciar a las líneas U-937 y HL-60, aunque no detiene la proliferación de la HL-60, pero sí la de la U-937. Induce multinuclearidad en ambas líneas, aumenta la esterasa no específica y la reducción de NBT sinérgica con TNF (96). El IFN $\gamma$  incrementa de 3 a 6 veces el mRNA de la subunidad  $\beta$  del receptor para GM-CSF al tiempo que lo estabiliza, pero no afecta al mRNA de la subunidad  $\alpha$ . Incrementa los receptores para IL-2 e IL-4, reduce los niveles del receptor de TNF (91). IFN $\gamma$  induce la síntesis de M-CSF y G-CSF (26).



El IFN $\gamma$  corrige los defectos en enfermedad granulomatosa. En enfermedades crónicas moviliza reservas de energía al sistema inmune lo cual resulta en una marcada pérdida por diatesis. Regula también el metabolismo de lípidos deteniendo a la lipasa de lipoproteínas (88).

El efecto antiproliferativo de IFN $\gamma$  en células tumorales parece mediado por linfotoxinas, aunque se piensa que sus mecanismos de inhibición pueden ser desencadenados también a través de:

- Inducción de enzimas antivirales
- Inducción de genes supresores estimulados por él, pero de función y estructura desconocida

- Modulación de productos de oncogenes
- Regulación de genes de factores de crecimiento
- Acción directa sobre oncogenes del Tumor
- Aumento de defensas del huésped.

Por otra parte, se ha observado que en la línea HeLa incrementa 3 veces la expresión del oncogén c-myc sin afectar la proliferación y que su efecto supresivo en las células tumorales es mejor si se le combina con TNF (88).

El IFN $\gamma$  no es absorbido por vía intramuscular, si se aplica en forma intravenosa desaparece de la circulación rápidamente, pero su respuesta puede mantenerse mediante infusión continua. Las dosis mayores son mejor toleradas si se administran lentamente. Este factor es detectado en el suero de personas sanas y enfermas, se ha observado que en algunas inmunodeficiencias su nivel es menor, pero en pacientes con SIDA los niveles de esta molécula se ven incrementados (88, 97).

Los factores que se han descrito hasta este momento, CSF's, IL-1 e IFN $\gamma$  participan en mayor o menor medida en los procesos de proliferación, diferenciación y activación de las células sanguíneas permitiendo al organismo mantener su homeostasis. De entre todos los tipos celulares originados a partir de la célula tallo mediante la interacción con estas moléculas, nos ocuparemos de la célula fagocítica por excelencia, el macrófago.

## MACROFAGOS RESIDENTES

La sobrevivencia depende de la defensa efectiva contra invasores foráneos, del reconocimiento de lo propio y lo extraño. Los organismos a través de la evolución han adquirido las células especializadas para cubrir estas necesidades. Una de esas células es el macrófago (9).

El macrófago al igual que las otras células sanguíneas de la línea mielóide tiene su origen en la célula tallo totipotencial que se encuentra en la médula ósea (98). La célula tallo originará la unidad formadora de colonias mixta, que a su vez engendra al progenitor bipotencial de macrófagos y granulocitos, la unidad formadora de colonias de granulocitos macrófagos que finalmente, genera a la primera célula con características exclusivas de la línea macrofágica, el monoblasto (99, 100).

El monoblasto es una célula grande, con un núcleo que contiene cromatina dispersa y de arreglo muy fino, es muy difícil distinguirlo del mieloblasto que origina los granulocitos. La siguiente etapa en el desarrollo la constituye el promonocito. En esta célula se aprecia un núcleo irregular profundamente dentado y con filamentos esparcidos en el citoplasma. En este estadio, ya es capaz de realizar fagocitosis.

El promonocito originará al monocito, la célula madura de mayor tamaño entre todos los tipos celulares sanguíneos ya que puede alcanzar 15  $\mu$  de diámetro. Presenta abundante citoplasma granular, núcleo excéntrico con forma arrionada o "de frijol" y de gran tamaño. Su membrana presenta una gran ondulación, lo que reduce la repulsión que pudiese sufrir por otras células o superficies. Es capaz de adherirse, si lo hace, los gránulos y el citoplasma se sitúan en el centro, dejando al citoplasma limpio (100). En el camino de madurez del monocito actuaron en orden secuencial moléculas proliferadoras y diferenciadoras como IL-3, GM-CSF y M-CSF entre otras, cada una ejerciendo su efecto a través de la interacción con su propio receptor (28).

El monocito abandona la médula tan pronto como el promonocito termina su última mitosis. En el torrente sanguíneo el monocito vaga sin un patrón establecido, aunque su migración se puede ver influenciada en respuesta a daño tisular. Ya no prolifera mas, aunque eso puede verse compensado por el hecho de que presenta un periodo de vida mayor que el de muchas de las células sanguíneas, permaneciendo en el organismo durante varios meses (100). El monocito puede ingresar a algún tejido y anclarse volviéndose residente o bien continuar en circulación. Ya sea en circulación o fijo, alcanzará su etapa de madurez final y se volverá macrófago.

Los macrófagos secretan más de 50 proteínas. Con la secreción de esos factores, desempeñan un papel muy importante en la defensa del organismo pero sus acciones no se limitan a ello, al igual que los granulocitos; los macrófagos son capaces de engullir partículas o microorganismos mediante el fenómeno denominado fagocitosis que puede ser independiente de opsonización si las partículas ingeridas no están cubiertas por anticuerpo o bien dependiente de opsonina si la partícula está envuelta por anticuerpos y donde los receptores para inmunoglobulinas son indispensables (100).

Los cambios de estado del citoplasma de sol a gel que le permiten al macrófago desarrollar esta capacidad reflejan el estado físico y de asociación de proteínas contráctiles, que a su vez son regulados por pH, carga eléctrica, combustible celular, superficie de membrana, el metabolismo energético, la temperatura y los cationes, mientras que para la fagocitosis también son importantes la opsonización, interacción célula-partícula y naturaleza de la partícula (101, 102).

Se necesitan 3 eventos para que se de la ingestión:

- Adhesión célula partícula
- Activación celular
- Proyección de la membrana envolvente y su fusión (103).

Dado que la fagocitosis es tan antigua como la vida misma, no es extraño que algunas de las citocinas que regulan la función del fagocito también sean muy antiguas (9).

Otro de los fenómenos en el que los macrófagos son actores importantes es el mecanismo de defensa antitumoral ya sea fagocitando o por ADCC (104, 105). Los macrófagos asociados a tumores (TAM del Inglés Tumor Associated Macrophages) afectan procesos diversos en los tejidos neoplásicos como la vascularización, crecimiento y formación del estroma (105). Los TAM tienen elevado número de moléculas MHC-II y pueden presentar antígenos y activar a los linfocitos T y NK o inhibirlos mediante la secreción de PGE<sub>2</sub>. Los TAM no son citotóxicos en ausencia de estímulo, aún cuando el tumor secreta GM-CSF ya que si este factor es derivado del tumor disminuye su citotoxicidad (105). La activación de los TAM puede lograrse con IFN $\gamma$  o productos bacterianos (105).

Las poblaciones de macrófagos en el organismo no son homogéneas, dependiendo del órgano donde se encuentren, los macrófagos adquieren caracteres particulares y es por ello que se pueden distinguir poblaciones como los macrófagos alveolares de pulmón, células de Kupffer en el hígado, osteoclastos en los huesos, microglia en el cerebro, mesangiales en riñón y los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal (100).

La cavidad peritoneal es considerada conveniente para el estudio de los fagocitos tanto en condiciones patológicas como en estados normales debido a que:

- Contiene una población finita de células caracterizables.
- La población total es relativamente manejable y fácilmente se obtienen.
- Las células están distribuidas en todo el fluido, por lo que las alicuotas extraídas son representativas de toda la población.
- Los números celulares son fácilmente cuantificables por métodos convencionales y cambios en ella son notados fácilmente.

El lavado de la cavidad peritoneal sin estimular acompañado de un ligero masaje proporciona una suspensión celular de composición variable según la especie y que contiene principalmente macrófagos granulocitos y linfocitos. En el ratón también se presentan monocitos. El número celular obtenido de la cavidad puede incrementarse mediante la infección en ella de diferentes agentes, aunque debe tenerse en cuenta que los macrófagos obtenidos de esta forma no son iguales a los que existen en ella de forma natural y que la respuesta funcional será en muchas ocasiones diferente (104).

Para la descripción morfológica de los macrófagos residentes de ratón nos basaremos en las observaciones de Daems (104).

La morfología de estos macrófagos es la de células grandes aunque no uniforme en apariencia. Inmediatamente después de extraídos son redondos, pero cuando se les permite adherir adquieren formas alargadas y planas. Su membrana está llena de lamelipodios así como de extrusiones lameliformes. Ambas estructuras cambian dependiendo de la superficie a la que se adhieran y del grado de estimulación, así por ejemplo, los lamelipodios aumentan cuando se presenta endocitosis. Su membrana plasmática presenta estructura trilaminar, subyaciéndola se encuentra una red de filamentos a la que a su vez le siguen identaciones y vesículas de diverso tamaño ya dentro del citoplasma.

El centro controlador de la actividad, el núcleo, presenta una forma irregular, profundamente indentado, con cromatina dispersa así como un gran número de poros nucleares. Se presentan 1 o 2 nucleolos.

Los macrófagos sin estimular presentan un número limitado de lisosomas con estructura y tamaño variable con una membrana limitante que semeja a la plasmática. Su aparato de Golgi presenta 6 crestas distribuidas en un patrón radial rodeadas por las estructuras bien desarrolladas del retículo endoplasmático rugoso con el que se encuentran asociadas también las mitocondrias.

La función del macrófago dentro de los mecanismos de defensa inmune se considera dentro de la inmunidad celular, sin embargo; muchas de sus funciones son activadas por las moléculas secretadas por los linfocitos B, los anticuerpos (ab) o inmunoglobulinas (Ig), cerrándose de esta forma el circuito de inmunidad celular-inmunidad humoral. La interacción entre las Ig y el macrófago se da a través de la unión de esta molécula a un receptor específico presente en la membrana del macrófago conocido como receptor Fc. De las inmunoglobulinas así como de sus receptores se trata en la siguiente sección.

## INMUNOGLOBULINAS

Los anticuerpos (ab) o inmunoglobulinas (Ig) son las moléculas encargadas del control de la respuesta humoral a un reto antigénico. Junto con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y el receptor de las células T son los encargados de enlazar antígenos. De las 3 moléculas, las inmunoglobulinas son las que reconocen un mayor rango de estructuras. Siempre inician sus funciones enlazando un antígeno y aunque su enlace no es covalente, es muy específico y fuerte (106).

Todos los anticuerpos presentan una estructura, carga y solubilidad muy similar. Poseen 4 cadenas 2 de ellas llamadas pesadas (H del Inglés Heavy) y 2 cadenas ligeras (L del inglés Light). Una cadena ligera siempre se encuentra unida a una cadena pesada, mientras que las cadenas pesadas se encuentran unidas entre sí. Los enlaces se realizan a través de la formación de puentes disulfuro. Cada cadena ligera y pesada presenta estructuras globulares de aproximadamente 110 a.á. que constituyen lo que se conoce como dominios de Ig. Todos los dominios presentan 2 hojas  $\beta$  plegadas constituidas de 3 ó 4 cadenas polipeptídicas antiparalelas. Otras moléculas que presenten estructuras similares son denominadas como miembros de la superfamilia del gen Ig ya que se piensa que poseen un ancestro común (106, 107).

Existen en el humano y ratón 5 tipos de cadenas pesadas que se denominan  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , y  $\gamma$ , que originan 5 clases de moléculas de inmunoglobulina que son IgA, IgM, IgD, IgE e IgG respectivamente. Solo existen 2 tipos de cadena ligera,  $\kappa$  y  $\lambda$ . En humano la relación de  $\kappa:\lambda$  es 3:1, mientras que para el ratón es 10:1 (100). Dentro de una molécula de inmunoglobulina las 2 cadenas pesadas serán iguales, asimismo, las 2 cadenas ligeras serán iguales debido al fenómeno que se conoce como exclusión génica y que impide a un mismo linfocito B generar diferentes tipos de cadenas ligeras (106, 107).

Dentro de una clase de Ig pueden existir pequeñas diferencias lo cual permite dividirlos en subclases, de esta forma; para el humano dentro de la clase IgA existen 2 subclases y dentro de la de IgG 4. La estructura de la Ig's se muestra en la figura 2.

Se podría pensar que si las inmunoglobulinas son estructuralmente semejantes, la cantidad de antígenos que podrían reconocer sería muy limitada, pero esto no ocurre. El secreto del gran repertorio defensivo de las Ig comenzó a descubrirse al estudiar la estructura de las cadenas y la organización de los genes. Al tratar a las moléculas de Ig con papaina, estas eran cortadas en 3 segmentos, 2 de ellos iguales que eran los encargados de fijar al antígeno por lo que se les denominó Fab (del Inglés Fragment antigen binding). La otra región podía cristalizarse, por lo que se le denominó Fc (del Inglés Fragment Crystalline). Si el tratamiento era con pepsina las 2 porciones Fab permanecen unidas (por lo que se les denomina  $F(ab')_2$ ) debido a que no se rompe una zona de la molécula denominada la región de bisagra y que es quien confiere a cada par cadena pesada-cadena ligera la flexibilidad para interactuar con los antígenos. Por su parte, el Fc no sufre cambios (100, 106, 107). Posteriores estudios mostraron que dentro de cada cadena pesada y ligera existían regiones con alta homología aún entre las diferentes clases de Ig, por lo que se les denominó regiones constantes. Sin embargo, el análisis de los extremos amino

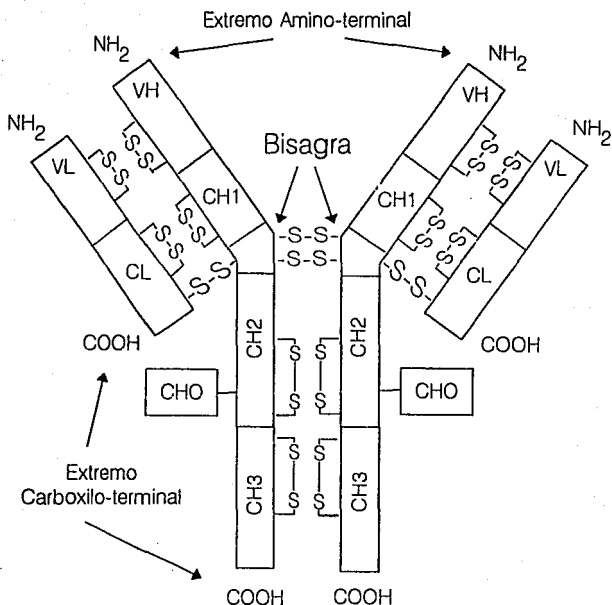


FIGURA 2. Estructura de la inmunoglobulina G. Se muestran los dominios constantes y variables, así como la región de bisagra. La estructura de esta molécula es muy conservada entre diferentes organismos.

Abreviaturas. CHn Cadena constante pesada. CL Cadena constante ligera. VL cadena variable ligera. VH Cadena variable pesada. CHO Cadena de carbohidratos. S-S Puente disulfuro. Tomado de referencia 100 con modificaciones.

terminales demostró que en ellos se encontraban regiones diferentes aún dentro de un mismo subtipo, por lo que se les denominó regiones variables. Dentro de las regiones variables existen 3 zonas donde las diferencias son mayores, se les denominó regiones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad CDR (del Inglés Complementarity Determining Region) y que son las encargadas del enlace de los antígenos. Buscando los genes de cada cadena, se encontró la respuesta final a la gran variedad de anticuerpos. La cantidad de genes para cada región permite combinarlos de tal manera que es posible construir  $10^9$  diferentes moléculas de Ig, cantidad mas que suficiente para enfrentar cualquier eventualidad antigénica (100, 106, 107).

En la mayoría de las especies de mamíferos, la mayor variabilidad se da en la clase de la IgG ya que ésta es la mas abundante. En humano se distinguen 4 subclases que son numeradas como IgG1 a 4 considerando su abundancia. En ratón se distinguen también 4 subclases que son numeradas como IgG1 a 3 y donde la IgG2 presenta 2 variantes, a y b (107).

Los anticuerpos tienen 2 funciones principales, enlazar a los antígenos y activar los mecanismos de defensa vía su Fc sobre células del sistema inmune. El comprender la estructura y función de las Ig ayudaría a desarrollar nuevas terapias contra alergias y autoinmunidad, donde se ven involucrados (108).

La respuesta al enlazarse la IgG con su receptor depende del tipo de IgG y la célula sobre la que se encuentre el receptor. Por ejemplo, la IgG1 y 2a provocan degranulación y liberación de mediadores por las células cebadas (mast cells). *In vitro* los linfocitos a los que se han unido complejos antígeno-anticuerpo bajan su número de receptores y detienen su proliferación (109).

Cuando el complejo antígeno-anticuerpo se une a su receptor, se internaliza y la presentación de antígeno es potenciada de 10 a 100 veces lo cual significa que se necesitan 10 a 100 veces menos antígeno para evocar respuesta de activación de linfocitos T (110).

Para que se pueda dar la unión con los complejos inmunes se requiere:

- Unión monovalente entre IgG-Ag-receptor IgG.
- Interacciones con otras IgG y receptores vecinos

- Recarreglo de los complejos unidos en agregados mayores para alcanzar una concentración efectiva de complejos sobre la superficie celular que permitan su ingestión (111).

Los mecanismos efectores de las inmunoglobulinas son controlados por su región Fc y los receptores para esta región presentes en diferentes células, de los que se trata a continuación.

## RECEPTORES Fc

Las inmunoglobulinas interactúan con moléculas presentes en la membrana de las células conocidas colectivamente como receptores Fc (FcR) ya que enlazan la porción cristalizable de las Ig. La mayoría de los FcR, incluidos los de la IgG pertenecen a la superfamilia de las IgG's. Para el humano y ratón los genes de la mayoría de los FcR se localizan en el brazo largo del cromosoma 1 (banda q23-24 en humano) (5, 112, 113).

Cada inmunoglobulina presenta un receptor específico, pero, considerando que la IgG es la más abundante de todas, no es de extrañarse que los receptores para ellas (FcγR) sean los que más atención han recibido.

Los FcγR son el enlace entre la respuesta celular y humoral del sistema inmune, ya que la asociación de la IgG a los receptores provoca efectos como: Liberación de leucotrienos, prostaglandinas, enzimas hidrolíticas, IL-1, IL-6 y TNF-α. Se involucran en la ADCC, fagocitosis, activación del estallido respiratorio; eliminación de complejos inmunes, regulación de producción de anticuerpos. Las formas solubles de ellos denominadas también IgG binding factors, tal vez ayuden al control de los niveles de IgG soluble (5, 108, 112, 114, 115, 116). La respuesta biológica desencadenada por la unión IgG-FcγR dependen del grado de diferenciación de la célula y la diversidad estructural y de expresión de los FcγR (117).

Los estudios sobre las características de los FcγR comenzaron en la década de los 70's y mostraron que había varios tipos de ellos distinguibles en un inicio sólo por su capacidad de enlazar IgG en forma monomérica o agregada, así como por su sensibilidad a tripsina y la capacidad de regenerarse después de tratarlos con ella (118, 119, 120, 121). Destacan los trabajos pioneros de Unkeless (119) que empleando la línea de células de ratón P388 e IgG radioactiva de diferentes subclases llegó a cuantificar los receptores presentes sobre ellas, logrando también distinguir al menos dos receptores diferentes. Aún con sus limitaciones, sus resultados marcaron la pauta para posteriores investigaciones.

Las especies seleccionadas para el estudio fueron principalmente ratón y humano, aunque existen reportes para otros organismos como cobayos donde se han descrito 2 diferentes FcγR y ratas (111, 122).

Al pasar los años, se fueron descubriendo los rasgos particulares de estas moléculas: peso molecular, afinidades a diferentes temperaturas y fuerzas iónicas, distribución, organización génica y sus moduladores. A este respecto, los primeros estudios donde se observó efecto inductor a la expresión de los FcγR se realizaron con medios condicionados de diferentes tipos celulares estimulados con mitógenos y que fueron probados sobre diversas poblaciones de células sanguíneas normales y leucémicas (122, 123, 124, 125, 126), donde se apreció también que el número de receptores cuantificado *in vivo* o *in vitro* puede ser influenciado por la concentración de IgG (127).

Los FcγR son ejemplos de moléculas con dominios conservados combinados con secuencias divergentes para incrementar sus funciones. Como miembros de la superfamilia de las IgGs, comparten características comunes. Todos tienen la secuencia líder en 2 exones, las diferencias se dan en los genes para los dominios intracelulares y transmembranales (112, 128, 129). La complejidad mostrada en los estudios provocó que se tomaran acuerdos para su nomenclatura que señalan que:

- Se debe emplear una letra griega para identificar a las IgG's que enlazan.
- Se debe emplear un número romano que indique el orden en que fue descrito el receptor del que se habla.

- Distintos genes dentro de un mismo grupo son denominados por letras mayúsculas del alfabeto A, B, C ... Z en ese orden.

- Transcritos diferentes del mismo gen se designan con la minúscula del gen que los codifica y un número arábigo en orden creciente que indique su orden de descripción (a1, a2, b1, b2 etc).

- Si hay subunidades de proteína asociadas se describen con una letra griega.

Así pues, FcγRIIIAα indica que se trata de la cadena de la subunidad alfa del receptor para inmunoglobulina gamma tipo 3, codificada por el gen A (112, 128).

Los dominios extracelulares de los receptores Fc presentan homología con los dominios Cγ2 de las inmunoglobulinas, aunque los bucles de los FcγR son más pequeños que los de otros miembros de la familia, ya que en ellos son de 43 a.a., mientras que para el resto son de 60 a 80. Estas estructuras son demasiado cortas para permitir una predicción confiable de su plegamiento comparado a un típico dominio IgG (108, 114, 128).

Por su parte los FcγR de ratón están también cercanamente asociados con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad la (130).

A los FcγR se les podría dividir en 3 grupos:

- El FcγRI humano y de ratón cuya característica más distintiva es su alta afinidad por IgG monomérica

- FcγRII de humano y FcγRIIb de ratón caracterizados por su amplia distribución

- FcγRIII transmembranal de humano y FcγRIIIa de ratón gracias a que son los más numerosos.

Dentro de cada grupo se presentaría homología en los dominios extracelulares (que se mantiene a nivel intergrupos). La homología se mantendría en la región transmembranal intragrupos (50-76%), pero esta desaparece entre los grupos (0-33%), para finalmente carecer de homología intra e intergrupala en la región citoplásmica (16-27%) excepto para el grupo 2 (128). En la figura 3 se muestran las estructuras de los FcγR.

A continuación se describen algunas características de los FcγR de cada grupo.

## RECEPTOR PARA INMUNOGLOBULINA G TIPO I

FcγRI: Receptor para inmunoglobulina G tipo I. Este receptor presenta alta afinidad por monómeros de IgG. La molécula humana pesa 70 kD y la de ratón 67 kD (5, 121). Está muy glicosilado, si se le retiran los azúcares su peso se reduce a 55 kD. Se encuentra presente en macrófagos (15 a 40 x 10<sup>3</sup>/ célula), monocitos y neutrófilos tratados con IFNγ (5). El taller internacional de antígenos de diferenciación designó a este receptor como CD64 (112, 128).

El receptor humano es reconocido por los anticuerpos 32, 62, 22, 44 y 197. Los abs 22 y 44 se unen al mismo epítipo, que es diferente al que reconocen 32 y 62 que también presentan un mismo sitio de unión. El 197 reconoce los mismos epítopos de los 4 abs mencionados, además de presentar la capacidad de unirse al FcγRI por su porción Fc ya que es IgG2a de ratón. Esta característica le permite ser el único que inhibe el enlace de IgG al receptor (131, 132). No se han reportado anticuerpos contra el receptor I de ratón, es por ello que los reportes acerca de sus funciones son tan limitados.

A pesar de la carencia de anticuerpos contra el FcγRI de ratón, éste fue aislado de la línea P388 mediante el uso de oligonucleótidos. Muestra 4 posibles sitios de N glicosilación. En el ratón también se localiza en el cromosoma 1 (133). La comparación de receptores entre especies señala que se presenta 65-75% de homología con el FcγRI del humano en la región extracelular y transmembranal, pero en la región citoplásmica el de ratón es 22 a.a. mayor (84 vs 63 a.a.) y la homología baja a 25% (5, 112, 128).



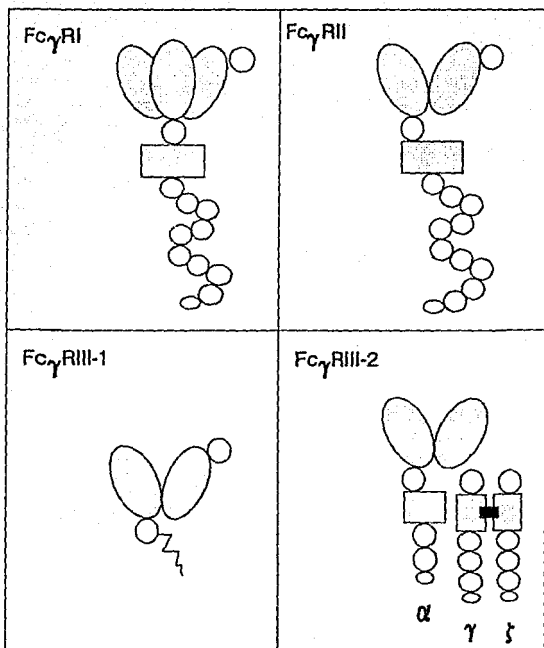


Figura 3. Estructura de los receptores Fc para Inmunoglobulina G. Los óvalos grandes representan los dominios tipo IgG, los rectángulos los dominios transmembranales, la línea en zig-zag el enlace glicosil-fosfatidilinositol, la cadena de círculos los dominios citoplasmáticos. Se muestran también las cadenas gamma y dzeta asociadas al receptor III-A (Tomado de referencia 150 con modificaciones).

Por otra parte, el receptor I es muy similar en todos los humanos, aunque existen individuos que no lo presentan. Es reciclable en los monocitos, no así en la línea U-937 (5).

El receptor humano presenta el siguiente orden de afinidad por monómeros de IgG humana: IgG1>IgG3>>>IgG4 no interactúa con IgG2. También puede enlazar IgG's de ratón con la siguiente afinidad: IgG2a> IgG3 >>>IgG1, 2b (5, 128).

Por su parte el receptor de ratón enlaza sus propias IgG con el siguiente patrón: IgG2a, 2b>IgG1>>>IgG3, mientras que la afinidad por las IgG humanas es IgG3>IgG1>IgG4>>>IgG2 (5, 128).

Dada la afinidad por IgG monomérica en ambas especies, se piensa que su acción pudiera ser obstaculizada por la IgG en plasma (134).

La interacción IgG-FcγRI involucra al dominio Cy2 de la IgG así como los dominios tipo IgG del propio receptor, de los cuales 2 son idénticos a los de los FcγR II y III, pero el 3o muestra poca similitud, por lo que se propone que este dominio es el que confiere la alta afinidad. La valencia del FcγRI por la IgG es 1 (5, 112, 128, 135). En el humano se presentan 3 genes diferentes organizados en 6 exones, 2 codificando para el péptido señal, 1 para cada dominio tipo IgG y 1 para las regiones transmembranal-citoplasmática. Los genes originan transcritos de 1.7 Kb o de 1.6 Kb en respuesta al IFNγ (136, 137).

Se presentan 3 distintos cDNA's que codifican para 292 a.a. extracelulares con los 3 dominios tipo IgG, una región transmembranal de 21 a.a. y un dominio citoplasmático de 31 ó 61 a.a. cargado. Recientemente se ha reportado que uno de los genes codifica para un receptor soluble (136).

El receptor tipo I presenta asociación con un homodímero de la cadena y del FcεRI en los macrófagos normales, no así en las células leucémicas. Esta subunidad no es indispensable para su expresión, a diferencia de lo que ocurre con el FcγRIII (ver más adelante) (136).

## EFFECTOS Y REGULACION DE LA EXPRESION DE FcγRI.

La expresión del FcγRI se ve incrementada por IFNγ y lipoproteínas de baja densidad. IL-6 incrementa la ADCC mediada por FcγRI sin afectar sus números, mientras que IL-4, disminuye sus niveles. Los Glucocorticoides inhiben su aumento en PMN mediado por IFNγ (5, 7, 90, 92, 138, 139).

M-CSF incrementa los receptores para Fc tipo I pero no en niveles significativos (93). IL-1 incrementa sus números en la línea monocítica humana THP-1, sinergizando con IFNγ para este efecto (140). IL-10 incrementa su expresión en monocitos humanos (141). IFNα y GM-CSF incrementan su expresión. IL-1β, IL-2, TNFα y TNFβ aumentan sus niveles si se combinan con PMA (7).

Pacientes con carcinoma escamoso de la faringe o boca tratados con G-CSF subcutáneo durante 24 hrs después de la quimioterapia, presentaron un incremento de FcγRI lo que origina aumento en la ADCC sin embargo; la inducción *in vitro* por este factor sobre las células de los pacientes es muy débil (142).

Erbe (143) reporta que G-CSF incrementa la lisis de EA en HL-60 mediada por este receptor pero sin incrementar su número, lo cual demuestra que la ADCC puede estar relacionada o ser independiente de un incremento en el número de FcγR.

La Dexametasona (DEX) también incrementan FcγRI sobre monocitos humanos en combinación con IFNγ, pero presenta el efecto contrario en las líneas HL-60 y U-937, donde inhibe al IFNγ en su inducción y los niveles basales de receptores, así como también los receptores en los polimorfonucleares (PMN) (7, 144).

El receptor tipo I participa en la liberación de anión superóxido, media fagocitosis, ADCC, secreción de IL-6, TNF- $\alpha$  (5, 136). La activación de la NADPH oxidasa en PMN es mediada por Fc $\gamma$ RI (104, 137). Los Fc $\gamma$ RI inducidos en neutrófilos por IFN $\gamma$  les permiten matar blancos extracelulares e hibridomas (142, 143, 144). IL-6 incrementa lisis de EA en la U-937 a través del receptor I (6). Los macrófagos de una cepa que no responden a endotoxina debido a bajos niveles de Fc $\gamma$ R, lo hacen si se tratan con IFN $\beta$ , ya que este incrementa la afinidad del Fc $\gamma$ RI (145, 146).

En el estudio de los mecanismos de acción del Fc $\gamma$ RI se han empleado todos los anticuerpos monoclonales contra el receptor humano. Se ha observado que éstos ab potenciaron la lisis de hibridomas, pero para ello es necesario entrecruzamientos con los otros receptores o emplear más de 1 anticuerpo al mismo tiempo (131). Así por ejemplo:

El Fc $\gamma$ RI media la producción de superóxido en monocitos y en la U-937, pero para ello era necesario emplear primero al anticuerpo 32 y posteriormente un ab dirigido contra él. El efecto era dosis dependiente del 2o anticuerpo y duraba más de 90 minutos, presentándose una estimulación grande en los 3 primeros minutos (147). El efecto es el mismo si se empleaba en vez del secundario 2 anticuerpos contra el Fc $\gamma$ RI (32 y 22) que reconocen diferentes sitios del receptor (147).

Si se emplea el anticuerpo 197, que reconoce 2 sitios del receptor y además se une a él por su Fc ya que es IgG2a de ratón, no era necesario emplear otro anticuerpo para la generación de superóxido, a menos que se le cortara la porción Fc (147).

Si las células se volvían a estimular con PMA o IgG se reactiva la liberación de superóxido, lo cual indica que la suspensión no fue por inhibición de la oxidasa. Este efecto parece depender también de la asociación con citoesqueleto (147).

Aún cuando el Fc $\gamma$ RI está ocupado, la generación del superóxido se detiene, pero el que se vuelva a reactivar indica que no se paró por agotamiento del sustrato, ni por internalización del receptor ya que se requieren más de 90 minutos para ello. Hay 2 posibles hipótesis para explicarlo: La activación dura mientras el ligando está ocupado, lo cual implica que el máximo de respuesta se da al llegar a la constante de equilibrio

- Cada receptor manda sólo una señal aun cuando sigan ocupados, por lo tanto, la curva daría una relación lineal y el efecto se detendría cuando todos hubiesen enviado su señal, que parece ser lo que encontraron (147).

## RECEPTOR PARA INMUNOGLOBULINA G TIPO II

Los Fc $\gamma$ RII son los de más amplia distribución. Se les encuentra en casi todas las células sanguíneas, sólo las NK no los poseen. Se le ha reportado también en placenta y en células Langherhans, pero su función en ellas es desconocida. Su número varía desde 1000 a 4610 Fc $\gamma$ RII en plaquetas según el conteo con abs (148) mientras que se reportan 100000 en macrófagos de ratón y de 7300 a 38000 Fc $\gamma$ RII por célula en los monocitos humanos (135). El peso reportado para la molécula es de 40 kD ó 29, 31, 33 y 36 sin azúcar tanto en ratón como humano (112, 128).

Su afinidad por monómeros de IgG es tan baja que no ha podido evaluarse (112, 135). Su utilidad radica en su capacidad de enlazar a los complejos inmunes y que ha permitido determinar las siguientes afinidades para complejos IgG de ratón y humano en ambas especies:

Fc $\gamma$ RII humano enlaza IgG1=IgG3>>IgG2>IgG4 propias. Su afinidad por las de ratón es IgG1=IgG2b>>IgG2a>IgG3 (5, 136).

Por su parte el receptor de ratón enlaza las IgG propias en el siguiente orden IgG2b=IgG2a>IgG1>>IgG3, mientras que las IgG humanas son unidas por este receptor con el siguiente patrón IgG3>IgG1>IgG4>>IgG2 (5, 112, 136).

Para la interacción con las IgG's, nuevamente el dominio C $\gamma$ 2 es el importante (112, 136, 137).

Se le ha denominado CDw32 y todos los anticuerpos que lo reconocen inhiben el enlace de los complejos. En humano se han reportado los siguientes anticuerpos: IV.3, KuFc79 y 2e1 (131). El anticuerpo 2.4G2 es el único reportado contra un Fc $\gamma$ R de ratón (118).

El "prototipo" de este receptor lo constituye el Fc $\gamma$ RII del ratón. En este mamífero se han aislado 2 diferentes cDNA's denominados b1 y b2 que se derivan por maduración alternativa de los exones que codifican para el dominio citoplasmático, dando proteínas con una diferencia de 47 a. a. de longitud. La expresión de b1 ha sido descrita en linfocitos, mientras que la b2 es expresada en macrófagos (128).

En humano la situación es más complicada. Existen un mínimo de 3 genes que originan 6 transcritos que generan proteínas con 180 a.a. extracelulares con 2 dominios IgG, región transmembranal de 24-26 a.a. y citoplasmática de 76, 42 ó 44 a.a. (112, 128, 136).

Del gen IIB se derivan 3 transcritos por maduración diferencial en los exones que codifican la secuencia señal o la región citoplasmática, lo que genera diferencias en la región citoplasmática (2 de ellos) y en 1 varía el exón que codifica para el péptido señal (148, 149).

Los transcritos de IIB son hallados en monocitos-macrófagos, linfocitos y células pluriptenciales, mientras que no se detecta en NK, neutrófilos y líneas de linfocitos T. De los receptores para IgG solubles, es posible que uno de ellos derive de este gen (114, 148).

El gen IIA genera 2 transcritos de 1.8 y 2.5 Kb como resultado de una poliadenilación alternativa, mientras que IIC genera un transcrito de 1.8 Kb. IIA es diferente a IIB en la secuencia señal y dominio citoplasmático, diferente a IIC en la secuencia señal, mientras que IIB y IIC solo presentan diferencias en la secuencia señal. El gen de IIA es igual al del Fc $\gamma$ RIII de ratón y IIC al Fc $\gamma$ RII (128, 136, 148, 149, 150).

La importancia de tanta variación en humano no está bien comprendida, pero para el ratón se ha mostrado que un cambio en la región citoplásmica consistente en la inserción de 47 a.a. convierte a un receptor capaz de internalizar por endocitosis vía sitios de envoltura conteniendo clatrina y de producir fusión con lisosomas en una forma carente de estas propiedades (137).

Se supone que esta variedad de receptores genera un rango amplio de señales al enlazar su ligando. IIA y IIC son expresados en macrófagos, neutrófilos, HL-60 y K562, no se les encuentra en linfocitos o NK. No se sabe que gen para Fc $\gamma$ RII se expresa en las plaquetas (148).

El gen para IIA presenta dos alelos que pueden diferenciarse gracias a su capacidad de enlazar IgG, por su capacidad de hacer rosetas, sus patrones isoeléctricos, su mediación de ADCC y la respuesta proliferativa de linfocitos T a anti-CD3 de subtipo IgG1 (137, 151). Esto se debe a que a nivel de DNA se observó un cambio de una Guanina por Adenina en la posición 519, que trae como consecuencia una sustitución en la posición 133 de la proteína de una histidina por arginina, lo que da los fenotipos HR (High Responder) y LR (Low Responder). Se cree que el cambio en el DNA en la posición 519 es una mutación, ya que es parte de un dímero CpG, un sitio de metilación de DNA humano y una "mancha caliente" para mutaciones debido a la desaminación de metilcitosina a timidina (151).

Se han reportado otras diferencias en los a.a. asociadas con los fenotipos: HR his 133 y gln 27 vs arg 133 y cys 27 en LR (137). La frecuencia de distribución hace suponer que hay 2 alelos, N y n, dando los genotipos NN o Nn con respuesta buena y el recesivo nn (140, 148). La distribución de alelos varía entre las poblaciones así, para los Chinos, 50% presentan

genotipo LR siendo completamente sanos, mientras que en los caucásicos es el 20% de la población la LR (151).

## EFFECTOS Y REGULACION DE LA EXPRESION DEL FcγRII

La opinión general era que no existe ninguna molécula con la propiedad de incrementar la expresión de este receptor en ratón o humano, sin embargo, existen varios reportes que señalan incremento en sus niveles en respuesta a:

GM-CSF y G-CSF que aumentan su expresión en 2% sobre la línea U937 (152). Erbe (143) independientemente reporta un incremento similar sobre la U937, pero no lo considera significativo.

Los medios condicionados de linfocitos estimulados con fitohemaglutinina incrementan los FcγRII (152). Ratones defectuosos en su respuesta a LPS tratados con IFNβ incrementan sus FcγRII y mejoran su respuesta (145, 146).

IL-6 incrementa sus niveles sobre la WEHI y M1, en este estudio, el incremento sólo se detecta a nivel de mRNA, no de proteína (153). El FcγRII no varía por tratamiento con IFNγ, GM-CSF, G-CSF y glucocorticoides en el estudio de Huizinga (137), mientras que para Gratagge (7), IFNα, IFNγ y GM-CSF lo incrementan, al igual que IL-1β, IL-2, TNFα o TNFβ si se combinan con PMA. El efecto es inhibido por dexametasona. Por otra parte, se ha reportado que IL-4 reduce su expresión (138).

Además de los reportes donde se señala aumento en la expresión de este receptor en respuesta a diferentes estímulos, se ha reportado potenciación o inhibición de sus funciones sin afectar su número, de esta forma, se ha demostrado que:

En los PMN el G-CSF, GM-CSF, IFNγ y TNFα incrementan la capacidad de matar hibridomas a través de este receptor (143). Por otra parte, las enzimas proteolíticas incrementan su afinidad al igual que la adenosina que controla sus funciones sin afectar su número. Los inhibidores de proteasas debilitan sus funciones sin reducir su expresión (5, 138).

Entre las funciones que controla el FcγRII se encuentran la fagocitosis, participa en la liberación de superóxido, liberación de enzimas lisosomales y de TNF-α aunque para ello las células deben exponerse a enzimas proteolíticas. Es señal negativa para linfocitos B en su proliferación y producción de IgG si se une a IgG de membrana (5, 136, 151).

La fusión *T. gondii* con la vacuola digestiva falla cuando entra vía FcγRIIb siempre y cuando este receptor presente sus dominios citoplasmáticos completos y el parásito se encuentre vivo a la hora de ser ingerido (154).

La activación de NADPH oxidasa y la liberación de gránulos por neutrófilos es mediada por este receptor (137).

La secreción de mediadores y agregación de las plaquetas es controlada en humanos por FcγRII y se ha empleado como modelo de estudio para conocer las rutas de señalización de este receptor.

Las investigaciones han permitido conocer que la generación de señales requiere del dominio Fc completo y un anticuerpo, y que la reacción puede ser diferente en HR y LR aunque a la fecha, no se sabe cual es la importancia de la diferente responsividad (148, 155, 156).

Para explicar la respuesta de las plaquetas existen varias hipótesis:

- Se piensa que existe enlace simultáneo entre el antígeno y el Fc por el anticuerpo lo que inmoviliza al FcγRII y desencadena la respuesta

- Que se presenta oligomerización de receptores para el envío de la señal

- Que se da una formación de complejo inmune entre anticuerpo y plaqueta para posteriormente activar otra plaqueta a través de Fc libre del anticuerpo

- Que se da la formación de un complejo Fc $\gamma$ R-anticuerpo-antígeno que genera la agregación de antígenos, lo que a su vez provoca la activación de la plaqueta.

Este último modelo ha sido probado para linfocitos T con CD3 y macrófagos con Fc $\gamma$ R, de aquí se originan 2 señales, una por el antígeno y otra por el Fc $\gamma$ R (156).

### RECEPTOR PARA INMUNOGLOBULINA G TIPO III

Los genes del Fc $\gamma$ RIII de humano y ratón son reconocidos como homólogos por su distribución, organización, secuencia y función. Se describió primero el gen de ratón a partir de líneas de macrófagos. La proteína pesa 50-80 kD, es una sialoglicoproteína que después de tratamiento con N glicanasa origina formas de 33 ó 29 kD o ambas, mientras que otros tratamientos sobre neutrófilos generan formas de 21-24 kD. Este receptor se designa como CD16 (112, 136, 137).

El Fc $\gamma$ RIII no enlaza monómeros de IgG, al igual que el Fc $\gamma$ RII, sólo enlaza polímeros con afinidad media (112, 128). Sus carbohidratos parecen importantes en el enlace ya que formas sin azúcares no enlazan la IgG, algo que no se ha observado en otros receptores Fc $\gamma$  (112, 128).

Los estudios en ratón y humano han arrojado los siguientes resultados en cuanto a afinidad por IgG:

Receptor humano por IgG humana IgG1=IgG3>>>IgG2=IgG4. Para IgG de ratón IgG3>IgG2a>IgG2b>>IgG1 (5, 112, 136).

Por su parte el receptor de ratón por su propia IgG muestra un patrón IgG2b>IgG2a>IgG1>>IgG3, mientras que para los anticuerpos humanos el orden es IgG3>IgG1>IgG4>>IgG2 (5, 112, 136).

Los monocitos en circulación no presentan Fc $\gamma$ RIII sino hasta que se les cultiva *in vitro*, aunque en los macrófagos maduros es el receptor más abundante. Se presenta también en PMN, NK, células mesenquimales de riñón y trofoblastos de placenta aunque en estos dos últimos tipos celulares se desconoce su función. En neutrófilos existen de 100 a 300 mil Fc $\gamma$ RIII por célula (137).

Parece que los dominios C $\gamma$ 2 de este receptor al igual que en los otros Fc $\gamma$ R también son importantes en la unión de la IgG ya que algunos estudios señalan que el sitio involucrado en el enlace es el residuo 235 (leucina) de la región NH<sub>2</sub> terminal del dominio IgG C $\gamma$ 2, aunque no se conoce si éste es el único sitio (137).

Los anticuerpos monoclonales diseñados contra el receptor tipo III, son 3G8, B73.1, Leu11 y 1D3. El primer Fc $\gamma$ R reconocido por anticuerpos monoclonales fue precisamente el tipo III con el ab 3G8 (131, 132, 157). El ab B73.1 reacciona con el Fc $\gamma$ RIII presente en neutrófilos y NK, bloqueando el sitio de unión de IgG. El anticuerpo monoclonal 1D3 distingue entre los productos de los 2 genes humanos, mientras que el B73.1 parece distinguir un epítipo específico del receptor de las NK. Se ha detectado un aloantígeno en el Fc $\gamma$ RIII humano que es reconocido por autoanticuerpos en pacientes con neutropenia autoinmune (158). Al receptor Fc $\gamma$ RIII de ratón en un inicio se le clasificó como Fc $\gamma$ RII debido a que presentó reactividad con el anticuerpo 2.4G2 (118, 131, 132).

En esta especie, sólo se reconoce un transcrito para esta molécula con una longitud de 1.6 Kb y que es 95% homólogo con el Fc $\gamma$ RII en la región extracelular. Las diferencias se dan en las regiones transmembranal y citoplasmática. Su eficiencia de transfección es 1-2% comparado con el Fc $\gamma$ RII, pero esta se ve aumentada de 50 a 100 veces si se transfectan al mismo tiempo los genes que codifican para la cadena  $\gamma$  y del Fc $\epsilon$ RI. De estos estudios se demostró que el Fc $\gamma$ RIII está compuesto de cadenas  $\alpha$  que enlazan Fc y cadenas  $\gamma$  o  $\zeta$  del Fc $\epsilon$ RI y

del complejo TCR/CD3 respectivamente que evitan su degradación en el retículo endoplasmático además de ser responsables de la transducción de señales. La mayoría de los receptores se asocian con la cadena  $\gamma$  (159).

El sistema humano presenta 2 genes para Fc $\gamma$ RIII denominados A y B localizados en el cromosoma 1 y estrechamente unidos, con una homología de 99%, pero donde un simple cambio de base en el codón 234 U por C ha convertido el codón de terminación UGA en el gen I (o B en ratón) en CGA en el gen II (o A en ratón), con lo que el gen II produce una proteína transmembranal. El gen II codifica para 190-210 a.a. extracelulares con 2 dominios tipo IgG seguidos por 21 a.a. hidrofóbicos y 4 hidrofílicos, mientras que la forma I codifica para 25 a.a. hidrofílicos (112, 128, 136, 137). El producto del gen B está anclado por un enlace fosfatidil inositol glicano (GPI) gracias al cambio en el a.a. 203 phe en A por ser en B. Si se manipulan genéticamente, se interconvierten, lo cual demuestra que es el cambio en ese a.a. el que controla el enlace GPI (157). Por otra parte, la proteína cambiada CD16-I no se expresa en membrana, lo cual hizo pensar que tal vez se encuentra asociada a otras cadenas. A diferencia de otros antígenos donde también se encuentran formas transmembranales y ancladas por GPI, los dos tipos de CD16 no se expresan en una misma célula (157).

Las diferencias en la región citoplasmática comenzaban a sospecharse al realizar estudios en pacientes con hemoglobinuria paroximal nocturna, cuyos neutrófilos carecían de Fc $\gamma$ RIII, pero no así sus macrófagos. En estos pacientes también se observaban los receptores solubles y un alto nivel de una fosfolipasa C específica para GPI. Otra evidencia de la diferencia fue que en NK donde sólo se presenta el receptor tipo III un anticuerpo dirigido contra él potenciaba su citotoxicidad, pero al tratarlos con una fosfolipasa específica, se observó que no se liberaban los receptores, por lo que se dedujo que presentaban anclaje diferente (108, 160).

Al igual que en el ratón, el Fc $\gamma$ RIII-I humano necesita coexpresión de la cadena  $\gamma$  del Fc $\epsilon$ RI o con la cadena  $\zeta$  del complejo CD3/TcR para que su transfección sea eficiente, condición no necesaria para el producto de IIIB. Los transcritos de la cadena  $\gamma$  se hallan en NK y macrófagos que no expresan el Fc $\epsilon$ RI, pero sí el Fc $\gamma$ RIII, lo cual implica un posible papel en la función, expresión o ambos (137, 161). La diferencia de las cadenas asociadas podría ser la que determina la capacidad citotóxica de la célula portadora (137).

En el humano el Fc $\gamma$ RIII presenta alelos que permiten definir las formas NA (Neutrophil Antigen System) debido a su respuesta a abs, NA1 responde más que NA2. Los del tipo NA2 también fagocitan menos EA. Las diferencias halladas a nivel de a.a. todavía no han podido asociarse con el polimorfismo (137, 162, 163).

Fc $\gamma$ RIII presenta formas solubles originadas de neutrófilos por ruptura del enlace GPI y de NK por tratamiento con los ésteres de forbol. En NK si se emplea 1, 10 hidrato de fenantrolina que inhibe las metaloproteasas al quelar Zn, Co y Ni se detiene la liberación del Fc $\gamma$ RIII. La metaloproteasa que controla este proceso parece encontrarse en membrana (161). Por otra parte la liberación de los receptores por neutrófilos no está controlada por una metaloproteasa sino, como ya se mencionó, por una proteína cinasa. Algunos estudios indican que la forma soluble también podría originarse del Fc $\gamma$ RIIIa (136).

## EFFECTOS Y CONTROL DE LA EXPRESION DE Fc $\gamma$ RIII

El Fc $\gamma$ RIIIb es inducido por IFN $\gamma$  y TGFB, no se conoce quien induce el tipo IIIa. El tioglicolato también lo induce en macrófagos. Es inhibido por glucocorticoides y TNF- $\alpha$  (IIIb) así como por IL-4. La adenosina también controla sus funciones pero sin hacer cambios en su número (5, 112, 128, 136, 138, 143).

La Dexametasona sola o combinada con IFN $\gamma$  incrementa sus niveles hasta en un 30%, aunque no se sabe si el incremento es de relevancia para las funciones (144). Fc $\gamma$ RIII es inducido por el dimetil sulfoxido (DMSO) en la línea HL-60 (152).

La incubación durante 2 hrs con PMA hace perder a las NK su capacidad para ADCC debido a la pérdida de sus Fc $\gamma$ RIII, algunos de los cuales son liberados como proteínas de 29 kD. El efecto de PMA también se presenta en PMN (161).

Entre los efectos que controlan estos receptores se reporta que:

El CD16-I no media la ADCC ni la liberación de enzimas y gránulos o la fagocitosis, por lo que se postula que sólo es una trampa para los complejos inmunes que no activan neutrófilos. Se señala que puede mediar la ADCC y la fagocitosis sólo si actúa en forma conjunta con Fc $\gamma$ RII sugiriendo que es necesario alcanzar un cierto umbral de concentración antes de que actúe y potencie el efecto a través del receptor II. Sin embargo, existen otros reportes donde se señala que Fc $\gamma$ RIII sí puede mediar fagocitosis por parte de los neutrófilos de bacterias no opsonizadas si estas poseen sustancias similares a lectina en su superficie y que en el neutrófilo puede mediar destrucción de blancos cubiertos con IgG y regular la producción de esta molécula en células B al ser liberado así como inhibir su actividad al adherirse a las IgG de su superficie. Esta situación donde el ligando es receptor y el receptor es ligando se ha observado antes para la regulación de producción de IgE (137).

En la leucemia crónica mieloide (CML), la fagocitosis por parte de los neutrófilos es menor, y esto se atribuye a que se presenta un descenso de entre 15 a 60% en sus niveles de Fc $\gamma$ RIII, que son los encargados de mediar esta función (164).

Por otra parte, el CD16-II sí media fagocitosis y liberación de superóxido así como ADCC, liberación de enzimas y gránulos lisosomales (5, 136). Algunos individuos con Lupus pueden carecer del Fc $\gamma$ RIIb, al igual que individuos sanos donde no se presentan alteraciones en su respuesta inmune sin que se tenga una explicación convincente para ello (137). Las NK atacan tumores y presentan ADCC a través de sus Fc $\gamma$ RIII (116) y dado que es un receptor diferente al presente en neutrófilos y que es el único que poseen, se ha tomado como modelo para estudiar señales de transducción.

En las NK, la ocupación del Fc $\gamma$ RIII por su ligando o el uso de anticuerpos contra el receptor provoca el incremento de Ca<sup>2+</sup>, formación de inositol trifosfato, la fosforilación de la cadena  $\zeta$  de CD3 y de las fosfolipasas PLC- $\gamma$ 1 y PLC- $\gamma$ 2, por lo que se piensa que una proteína denominada p56lck está asociada o es físicamente inducida después de la unión del ligando, ya sea por las cadenas  $\gamma$  o  $\zeta$  o alguna otra proteína cinasa (159). Posteriormente se da la transcripción de citocinas y la activación de la ADCC (157, 161, 165).

El mecanismo que acopla Fc $\gamma$ RIII con la fosfolipasa se desconoce aunque se postula que pueden participar proteínas G o proteína-tirosina-cinasas (PTK). Sin embargo, los estudios indican que en las NK no se involucran proteínas G, mientras que las PLC se inhiben con un inhibidor de PTK.

Como se ha podido apreciar, los Fc $\gamma$ R presentan traslape de funciones además de que el entrecruzamiento (ocupación de más de un receptor por el antígeno o participación de varios receptores) parece ser importante. No obstante, al parecer sí presentan funciones específicas, por ejemplo: Para el sistema de ratón, Fc $\gamma$ RIIb2 media internalización y conducción a lisosomas de los ligandos en fibroblastos transfectados, mientras que Fc $\gamma$ RIIb1 carece de esta propiedad. Por otra parte, el dominio b1 citoplasmático es fosforilado en serina para el ratón, pero esto no ocurre en el humano, donde una maduración alternativa del exón que lo codifica provoca la pérdida del sitio de fosforilación, por lo que el papel de ésta en la función del receptor humano es incierto (112, 128).



Por otra parte, se ha observado que en el humano FcγRIIB internaliza en forma diferente blancos cubiertos con IgG y parece que ello depende de la región citoplásmica, por lo que se piensa que el enlace a otras moléculas podría ser necesario para su correcta función. La diferente expresión de IIB respecto a IIA y IIC indica que los 2 últimos se traslapan en funciones efectoras de fagocitos, mientras que IIB se relaciona a funciones de linfocitos (128).

El FcγRIIB es el único en los linfocitos B humanos y es capaz de inhibir su activación mediante el enlace de las IgG de su membrana, no ocurre endocitosis mediante este receptor, con lo que se previene la presentación de antígenos irrelevantes que pudieran haberse unido al receptor como parte de complejos inmunes (166).

Por su parte, el FcγRI inducido por IFNγ sobre PMN parece mediar la ADCC, mientras que los otros receptores no participan (144).

El ejemplo más claro de la relación función estructura lo aporta el FcγRIIA, donde la conservación de la estructura transmembranaral y en menor extensión la citoplásmica parecen indicar que son esenciales para la ADCC, mientras que la asociación con γ o ζ origina envío de señales diferentes a través de ellos (128, 159).

La mediación de señales por los FcγR también es difícil de entender dada su heterogeneidad. El aclarar el papel de cada FcγR en la señalización se vería favorecido por el estudio de subunidades específicas en células carentes del resto de ellas. Por otra parte, se necesita también contar con anticuerpos monoclonales contra los receptores de ratón ya que en estos organismos es en los que se desarrollan la mayoría de los estudios acerca de la biología de estas moléculas. El uso de los ab monoclonales contra los FcγR de ratón así como los que ya existen contra células humanas evitarían las ambigüedades presentes en varios reportes donde se señala por ejemplo que:

- El GM-CSF en un clon de leucemia mielóide induce FcγR hasta un 27%, efecto que también presenta la IL-3 (71).

- GM-CSF también aumenta los FcγR en macrófagos de ratón (167).

- La IL-6 induce un incremento de hasta 46% en los niveles de FcγR (71).

- IFNα y la prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) incrementan los FcγR sobre células linfoides de ratón y humano *in vitro* e *in vivo* (168).

- La timosina fracción 5 también incrementa los FcγR y al igual que con PGE<sub>2</sub>, el incremento en cAMP pudiera estar relacionado con ello (168).

- En células de microglia se incrementan los receptores al ser tratados con IFNγ, IL-1, TNFα y LPS. IL-1 sinergiza con IFNγ en el incremento de FcγR en macrófagos peritoneales (169).

Reportes donde no se señala que tipo o tipos de receptor son los inducidos por lo que cualquier especulación acerca de mecanismos de transducción es inútil.

Por otra parte, los estudios acerca del origen evolutivo de los receptores Fc, en particular de los FcγR se han valido de homología entre los receptores Fcα y Fcγ para suponer que provienen de un ancestro común y que a lo largo de la evolución se ha presentado selección para mantener los genes próximos (170).

Se propone que en el camino evolutivo, el ancestro FcR localizado en 1q23 sufrió una duplicación originando a los FcγR y FcεR. Una posterior duplicación en el locus g genera a los receptores de los grupos II y III. Posteriores duplicaciones en los genes ancestrales α y β generan 4 genes de baja afinidad que sufren divergencia posterior y una mutación en el sitio aceptor de división del tercer exón citoplásmico del gen II haciéndolo no funcional. La formación de un nuevo sitio aceptor origina la forma IIa', mientras que el otro gen II se queda como tal dando origen a IIB. Una nueva recombinación entre IIa' y III formaría al gen IIa.

Mientras todo esto ocurre, los genes III sólo se han separado. Un resumen de esta hipótesis del origen de los Fc $\gamma$ R se muestra en el cuadro 3.

No se han realizado estudios acerca de la divergencia con el receptor I, aunque se piensa que debió separarse temprano. Las últimas investigaciones han revelado que el Fc $\alpha$ RI presenta homología con Fc $\gamma$ RI y III así como con Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  lo que señala que poseen un mismo ancestro y que el esquema evolutivo tendrá que modificarse.

- a) Ancestro común FcR origina Fc $\gamma$  y Fc $\epsilon$
- b) En el locus  $\gamma$  2 duplicaciones  $\rightarrow$  Fc $\gamma$ III y II con el siguiente orden: III-II-III-II
- c) La pérdida del sitio aceptor provoca la formación de los locus III-IIa'-III-IIb
- d) Creación de un nuevo sitio aceptor y recombinación para dar la organización actual III2-IIa'-IIa'-III1-IIb.

**Cuadro 3.** Evolución de los genes Fc $\gamma$ R.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los estudios desarrollados acerca de los diferentes tipos de Fc $\gamma$ R han permitido conocer que cada receptor presenta distinta afinidad por la IgG, por ejemplo, el Fc $\gamma$ RI enlaza con alta afinidad los monómeros de inmunoglobulina, mientras que los Fc $\gamma$ RII y III interactúan con los polímeros de IgG. Los Fc $\gamma$ R presentan también diferente sensibilidad al tratamiento con tripsina, siendo los receptores Fc $\gamma$ RI y III eliminados de la membrana celular por la enzima, mientras que el Fc $\gamma$ RIII resiste sus efectos. En la caracterización de los Fc $\gamma$ R de humano también se han empleado anticuerpos monoclonales que permiten distinguir a los diferentes Fc $\gamma$ R, aunque todavía no existen comercialmente anticuerpos contra los Fc $\gamma$ R de ratón. Los estudios empleando las tres estrategias demuestran que los Fc $\gamma$ R de ratón y humano son muy semejantes.

Por otra parte, Interleucina 1 (IL-1) es capaz de inducir la expresión de receptores Fc (Fc $\gamma$ R) en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón (3), propiedad que comparte con otras moléculas como el Interferón Gamma (IFN $\gamma$ ) (90, 92). Sin embargo, no se conoce si los Fc $\gamma$ R inducidos por IL-1 en estas células presentan diferentes afinidades por IgG, resistencia a tripsina o si son reconocidos por los anticuerpos monoclonales contra los Fc $\gamma$ R de humano.

De esta forma, en la presente investigación se hará uso de las propiedades mencionadas de los Fc $\gamma$ R, así como de los anticuerpos monoclonales contra los Fc $\gamma$ R humanos, tratando de determinar las características de los Fc $\gamma$ R inducidos por IL-1 $\beta$  en los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón.

Consideramos de fundamental importancia determinar las propiedades de los Fc $\gamma$ R inducidos por la IL-1 $\beta$ , ya que esto ampliaría nuestros conocimientos acerca de las propiedades biológicas de IL-1, controladas a través de la expresión de ciertos Fc $\gamma$ R en los macrófagos, ya que las investigaciones desarrolladas a la fecha indican que si bien los diferentes tipos de Fc $\gamma$ R son muy semejantes, cada uno de ellos controla funciones específicas.

Finalmente, debido a la capacidad de IL-1 de mediar una gran cantidad de efectos tanto en el sistema mielóide como en el linfóide, se le está considerando como candidato para el tratamiento de diferentes padecimientos donde el sistema hematopoyético y el sistema inmune se ven alterados y donde la expresión de los Fc $\gamma$ R se encuentran disminuida. Se espera de esta forma corregir algunas de las deficiencias y ofrecer mejores condiciones de vida a los enfermos.

## HIPOTESIS

Hasta el momento se conocen tres tipos de receptores Fc para la inmunoglobulina G (Fc $\gamma$ R) tanto en ratón como en humanos cuya región extracelular presenta una alta homología entre las dos especies. Cada uno de los receptores presenta diferente afinidad por las IgG's y resistencia a tripsina. Además se han creado anticuerpos contra los Fc $\gamma$ R humanos que permiten distinguirlos.

Por otra parte, se sabe que IL-1 $\beta$  es capaz de inducir la expresión de Fc $\gamma$ R en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón aunque hasta el momento se desconocen las características particulares de los Fc $\gamma$ R inducidos por IL-1.

Por esta razón, se espera que al cultivar macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón con IL-1 $\beta$ , éstos expresarán Fc $\gamma$ R y será posible caracterizarlos en base a su reactividad con IgG séricas, su resistencia a la tripsina y probablemente mediante su reconocimiento por los anticuerpos contra los receptores humanos.

## OBJETIVOS

**Objetivo general:** Determinar las características de inhibición por *inmunoglobulinas*, resistencia a tripsina y de reconocimiento por anticuerpos contra los Fc $\gamma$ R humanos, de los Fc $\gamma$ R inducidos por IL-1 $\beta$  en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón.

### Objetivos particulares:

- Determinar la actividad inductora de los Fc $\gamma$ R por IFN $\gamma$  e IL-1 $\beta$  en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón.
- Determinar si los Fc $\gamma$ R inducidos por IL-1 $\beta$  en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón son bloqueados por inmunoglobulinas.
- Determinar si IL-1 $\beta$  induce Fc $\gamma$ R resistentes al tratamiento con tripsina en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón.
- Determinar si los Fc $\gamma$ R inducidos por IL-1 $\beta$  en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón son reconocidos por anticuerpos monoclonales contra los Fc $\gamma$ R humanos.

## MATERIALES Y METODOS

### Material Biológico.

En la presente investigación se emplearon ratones hembras de la cepa CD-1 de 4 a 6 semanas de edad obtenidos del bioterio de la FES-Zaragoza.

Se emplearon eritrocitos de los carneros del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM.

### Condiciones de cultivo.

Todo el manejo y obtención de células se realizó en una campana de cultivo que había sido desinfectada con alcohol al 70% en agua (v/v) y esterilizada con luz ultravioleta (U.V.) durante 15 minutos. Las células se mantuvieron en una incubadora con chaqueta de agua a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad saturante.

### Obtención de células de la cavidad peritoneal de ratón.

Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical para posteriormente realizar 2 lavados de la cavidad peritoneal con solución amortiguadora de fosfatos (PBS, apéndice 1). En el primer lavado se introdujeron 10 ml de PBS frío a la cavidad peritoneal con ayuda de jeringa y aguja estériles, se frotó suavemente la membrana peritoneal con la finalidad de poder colectar los macrófagos que ahí se encontraban, se extrajo lentamente el líquido y se colectó en tubos para centrifuga fríos. Se realizó un segundo lavado pero ahora sólo se emplearon 5 ml de PBS.

### Obtención del suero de ratón.

La sangre se obtuvo mediante punción cardiaca, se distribuyó en tubos para centrifuga y se dejó en el refrigerador a 4 °C durante 1 hr. Posteriormente fue centrifugada a 500g durante 15 minutos para separar el suero. Una vez que se obtuvo, se esterilizó por filtración con membranas Millipore (Millipore, USA) de 22µ de diámetro y se guardó en el refrigerador a 4 °C hasta el momento de su uso.

### Enriquecimiento de poblaciones celulares

Las células extraídas de la cavidad peritoneal se centrifugaron a 500 gravidades (g) durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se añadió medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma, USA; apéndice 2). A continuación se realizó un conteo de las células obtenidas con ayuda de un hemocitómetro (Boeckel, Alemania). Una vez conocido el número celular se procedió a distribuir las células en placas de microcultivo de 96 pozos con fondo en "U" (Nunclon, Dinamarca). En cada pozo se añadieron 200 µl con 4 x 10<sup>5</sup> células y se introdujeron a la incubadora durante 2 horas para aprovechar la capacidad de los macrófagos de adherirse a superficies plásticas o vidrio, lo que permitió separarlos de los granulocitos y linfocitos que también se encuentran en la cavidad peritoneal, pero que carecen de esta propiedad. Una vez transcurrido el tiempo, se retiró la placa de la incubadora, se cambió el medio de cultivo y se añadió medio nuevo, se resuspendió suavemente con una pipeta, se retiró el medio y se repitió el proceso otras 2 veces, esto tiene la finalidad de eliminar los granulocitos y linfocitos que pudiesen

haber quedado después de la adherencia. Con este procedimiento se obtienen poblaciones de macrófagos de hasta 85% de pureza.

Para la técnica de inmunofluorescencia, al momento de enriquecimiento de las poblaciones celulares, los macrófagos se distribuyeron en cámaras de microcultivo de 16 pozos (Nuncion, Dinamarca) procediendo de igual manera que si se tratara de placas de 96 pozos.

#### **Cultivo con los inductores.**

A las células que fueron enriquecidas por adherencia se les añadió RPMI-1640 suplementado con 10% de suero de caballo Gibco (Gibco, UK) que fue previamente desactivado durante 30 minutos a 56 °C (RPMI-SC) y el inductor correspondiente. IFN $\gamma$  (Immunex USA) se empleó a una concentración de 800 U/ml. La IL-1 $\beta$  (Immunex, USA) se empleó a una concentración de 80 ng/ml. Como control negativo se emplearon macrófagos a los que sólo se les añadió RPMI-SC. Las células así tratadas se mantuvieron durante 2 días en la incubadora. Transcurrido ese tiempo, se procedió a la evaluación de rosetas EA.

#### **Obtención de eritrocitos de camero.**

Los eritrocitos de camero se obtuvieron mediante punción yugular aséptica. Las células se colectaron en un tubo con solución de Alsever (apéndice 3) en una relación 1:4 y se mantuvieron en ella a 4 °C. Para garantizar su buen estado, no se emplearon eritrocitos que tuvieran más de 1 mes de extraídos.

#### **Titulación de eritrocitos de camero.**

Para conocer la concentración adecuada de inmunoglobulina G (IgG) anti-eritrocitos de camero y así garantizar que no habría agregación se procedió de la siguiente forma. En una microplaca de cultivo de 96 pozos de fondo "U" se distribuyeron pares de pozos con 25  $\mu$ l de diferentes concentraciones de IgG en PBS así como 2 pares de pozos con sólo PBS. A continuación a cada par se le añadió 25  $\mu$ l de una solución de eritrocitos de camero al 2% que habían sido previamente lavados 3 veces con PBS y centrifugación durante 5 minutos a 800g. Una vez que se añadieron los eritrocitos, la placa se colocó en una cámara húmeda con la finalidad de que los eritrocitos sedimentaran. Se dejaron ahí durante 1.5 hrs. Transcurrido el tiempo, se procedió a seleccionar la concentración de IgG, para ello; se observó aquel par de pozos en el que se hubiera formado un botón similar al de los pozos donde sólo se pusieron eritrocitos en PBS, una vez localizado, se eligió como concentración adecuada aquella que era 4 veces más diluida que el pozo observado, es decir, si el botón se formó en una concentración de IgG 1:500, se empleó para activar los eritrocitos una concentración 1:2000.

#### **Preparación de eritrocitos activados (EA).**

Una vez que se obtuvo la concentración adecuada, a la solución al 2% de eritrocitos se añadió la cantidad necesaria de IgG para obtenerla, se resuspendieron suavemente para no lisarlos y se incubaron durante 30 min. Transcurrido el tiempo se retiraron de la incubadora y se lavaron en PBS en el que fueron activados, quedando listos para su uso. Se recomienda no emplear eritrocitos activados de más de 4 días, así como mantenerlos a 4 °C.

### **Formación de rosetas EA.**

Las células que fueron mantenidas en la incubadora durante 2 días en presencia o ausencia del inductor se retiraron de la incubadora, se les quitó el sobrenadante y se lavaron 3 veces con RPMI-1640 y una ligera resuspensión. Se añadieron 200  $\mu$ l de RPMI-1640, se despegó a las células suavemente con un "gendarme", se añadieron 20  $\mu$ l de eritrocitos activados, se resuspendieron, se centrifugaron durante 5 min a 800g para formar un botón y garantizar así un mayor contacto entre macrófagos y EA, se introdujeron en la incubadora durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se retiró a las células, se resuspendieron suavemente con una pipeta Pasteur, se despegaron con ayuda de un "gendarme", se resuspendieron otra vez y se colocaron en un hemocitómetro para la evaluación.

En el presente trabajo, se consideró una célula que no forma roseta a aquel macrófago que tenía adheridos de 0 a 2 EA y como roseta a aquel que tuviese más de 3 EA adheridos a su membrana. Se contaron al menos 200 células y se expresaron los resultados como porcentaje.

### **Bloqueo de la formación de rosetas con suero de ratón.**

Para los ensayos donde se evaluó la inhibición de la formación de rosetas EA empleando el suero de ratón como fuente de inmunoglobulinas, a las células que se cultivaron en presencia de IL-1 $\beta$  se les retiró de la incubadora, se desechó el medio de cultivo, se lavaron con PBS y pipeteo suave 3 veces y se añadió nuevo medio de cultivo así como 13  $\mu$ l de suero de ratón. Las células se regresaron a la incubadora donde permanecieron durante 30 minutos para permitir la unión de las inmunoglobulinas a los Fc $\gamma$ R, para posteriormente ser retiradas de ella y proseguir con el ensayo de rosetas como se ha descrito con anterioridad.

### **Tratamiento con Tripsina**

En los experimentos donde se trató a las células con Tripsina se procedió de la siguiente forma. Después de los 2 días de cultivo en presencia o ausencia del inductor se retiró a las células de la incubadora, se retiró el medio de cultivo, se lavaron 3 veces mediante adición de PBS con pipeteo suave para finalmente añadir 200  $\mu$ l de una solución de Tripsina al 0.006% en PBS (p/v) (Apéndice 4) y dejarla actuar durante 7 minutos. Una vez tratadas, se procedió a lavar las células 3 veces con PBS frío y pipeteo suave, se añadió RPMI-1640 y los EA para desarrollar el ensayo de formación de rosetas como se ha descrito.

### **Inmunofluorescencia indirecta.**

Para evaluar si los anticuerpos monoclonales contra los Fc $\gamma$ R humanos reconocían a los Fc $\gamma$ R inducidos en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón por IL-1, se empleó la técnica de inmunofluorescencia indirecta. En ella, una vez que han transcurrido los 2 días de incubación de los macrófagos en presencia o ausencia de los inductores en las microcámaras, las células se retiraron de la incubadora, se desechó el medio de cultivo y se fijaron con acetona a -20 °C durante 5 minutos. Posteriormente se lavaron 3 veces con solución amortiguadora de fosfatos para fluorescencia (PBSI, apéndice 5) sumergiendo el portaobjeto donde han sido cultivadas con ayuda de la cámara de microcultivo en un recipiente que contenga suficiente PBSI para cubrirla por completo. Los lavados son de 5 minutos. Inmediatamente, se procedió a bloquear los posibles sitios de reacción inespecífica añadiendo a

las células una solución de albúmina de bovino al 1% (p/v) en PBS, manteniéndolas en una cámara húmeda durante una hora. Transcurrido ese tiempo, se añadió el anticuerpo primario y se mantuvo a las células durante una hora en la cámara húmeda, se retiraron de la cámara y se lavaron tres veces durante 5 min con PBSI en la forma descrita con anterioridad. Después se procedió a añadir el anticuerpo secundario e incubar las células en la cámara húmeda en completa oscuridad durante 45 min, posteriormente se lavaron 3 veces en PBSI, se contrastó durante 5 minutos con Azul de Evans que las hace verse rojas bajo luz U. V., se lavaron 3 veces más con PBSI, se montó con una gota de glicerina en PBS 50% (v/v) cubriendo la preparación con un cubreobjetos y observando con ayuda de un microscopio de epifluorescencia (Olympus, USA). Los anticuerpos que se emplearon son:

#### **Anticuerpos primarios:**

- MoAb 32.2, anticuerpo monoclonal de ratón anti-Fc $\gamma$ R1 humano (anti CD64), es de la subclase IgG1, se empleó en una dilución 1:10 en albúmina en PBS al 0.1% (p/v).
- MoAb IV.3, anticuerpo monoclonal de ratón anti-Fc $\gamma$ RII humano B (anti CD32), subclase IgG2b en una dilución 1:10 en albúmina en PBS al 0.1% (p/v).
- MoAb 3G8, anticuerpo monoclonal de ratón anti-Fc $\gamma$ RIII humano (anti CD16), subclase IgG1 en una dilución 1:10 en albúmina en PBS al 0.1% (p/v).

Todos estos anticuerpos son fabricados por Medarex, USA.

Como anticuerpo control se empleó el MoAb Ko 8.13, anticuerpo monoclonal de ratón anti-citoqueratinas subclase IgG2a diluido 1:320 en PBS y que es fabricado por Sigma, USA.

#### **Anticuerpo Secundario:**

- Anticuerpo policlonal de Chivo anti-inmunoglobulinas de ratón Conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (GAM-FITC) (F(ab) $'_2$ ) en una dilución de 1:50 en PBS. Es fabricado por Dakko, Dinamarca.

Todos los anticuerpos fueron mantenidos a 4 °C y el anticuerpo secundario a 4 °C y en oscuridad.



## RESULTADOS

### **Interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) e Interferón Gamma (IFN $\gamma$ ) presentan actividad inductora de Receptores Fc (Fc $\gamma$ R) en macrófagos residentes de cavidad peritoneal de ratón.**

Antes de realizar los estudios donde se emplearían la IgG sérica, la tripsina y los anticuerpos monoclonales para caracterizar los Fc $\gamma$ R inducidos por IL-1 $\beta$ ; fue necesario verificar si las moléculas de IFN $\gamma$  e IL-1 $\beta$  presentaban actividad inductora a la expresión de Fc $\gamma$ R en macrófagos residentes de cavidad peritoneal de ratón. Con esta finalidad, se cultivaron estas células durante 2 días en medio RPMI-1640 suplementado con suero de caballo y en presencia o ausencia de 800 U/ml de IFN $\gamma$  y de 80 ng/ml de IL-1 $\beta$ , dosis que se obtuvieron previamente mediante la realización de curva dosis respuesta cuantificando la inducción de Fc $\gamma$ R mediante el ensayo de formación de rosetas EA (Gráficas 1 y 2).

Nuestros resultados muestran que ambos factores inducen un claro incremento de Fc $\gamma$ R con respecto al cultivo sin inductores (Gráfica 3).

### **El suero de ratón disminuye la formación de rosetas EA en los macrófagos cultivados con IL-1 $\beta$ .**

Una vez que se determinó que IL-1 $\beta$  presentaba actividad inductora de Fc $\gamma$ R en los macrófagos residentes a los 2 días de cultivo, se procedió a determinar el efecto que tiene el suero de ratón, el cual contiene inmunoglobulinas inespecíficas, en la formación de rosetas EA en las células que habían sido cultivadas con este factor. Con esta finalidad, media hora antes de desarrollar los ensayos de formación de rosetas se añadió a los cultivos el suero de ratón.

Los resultados indicaron que los macrófagos cultivados en ausencia de IL-1 $\beta$  presentan una capacidad formadora de rosetas similar ya sea en presencia o ausencia del suero de ratón (Gráfica 4).

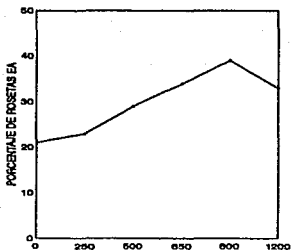
Por otra parte, los macrófagos que se cultivaron en presencia de IL-1 $\beta$ , a los que se añadió suero de ratón 30 minutos antes de desarrollar los ensayos de formación de rosetas, presentaron una disminución en su capacidad de enlazar los EA comparados con las células cultivadas con IL-1 $\beta$  en ausencia de suero de ratón (Gráfica 4).

Estos resultados indican la posible existencia de afinidad de los Fc $\gamma$ R inducidos por IL-1 $\beta$  a los anticuerpos inespecíficos presentes en el suero.

### **La afinidad de los receptores Fc inducidos por Interleucina 1 aumenta mediante el tratamiento con tripsina**

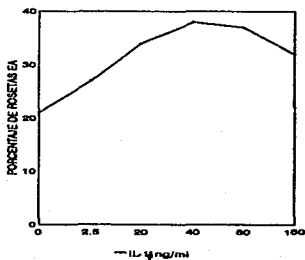
Se sabe que los Fc $\gamma$ R presentan diferente resistencia al tratamiento con tripsina. Con la finalidad de determinar si los receptores Fc $\gamma$ R inducidos por IL-1 $\beta$  en los macrófagos eran resistentes o no a esta enzima, a los macrófagos cultivados en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$  durante 2 días se les trató con una solución al 0.006 % de tripsina en PBS durante 7 minutos antes de realizar el ensayo de formación de rosetas.

El porcentaje de formación de rosetas de las células cultivadas en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$  fue igual después del tratamiento con la tripsina y mayor al observado en las células que no se trataron con la enzima (Gráfica 5). Es de llamar la atención que las células cultivadas en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$  tratadas con tripsina presentarían una mayor afinidad de los Fc $\gamma$ R que aquellas que no fueron tratadas con la enzima.



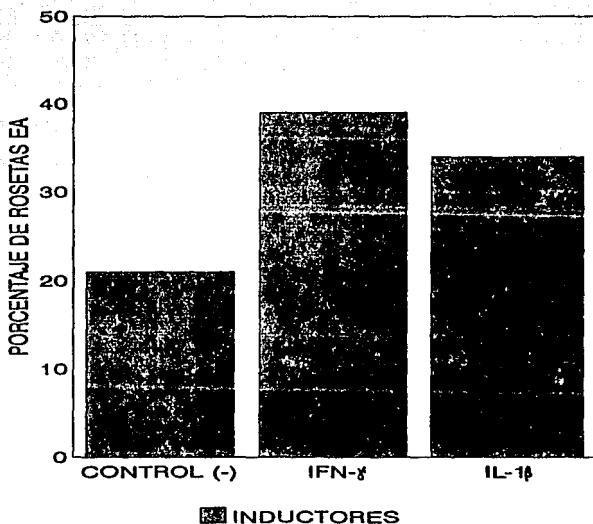
— IFN- $\gamma$  U/ml

**Gráfica 1.** Curva dosis respuesta de IFN- $\gamma$  en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón. Las células fueron mantenidas en presencia o ausencia del inductor

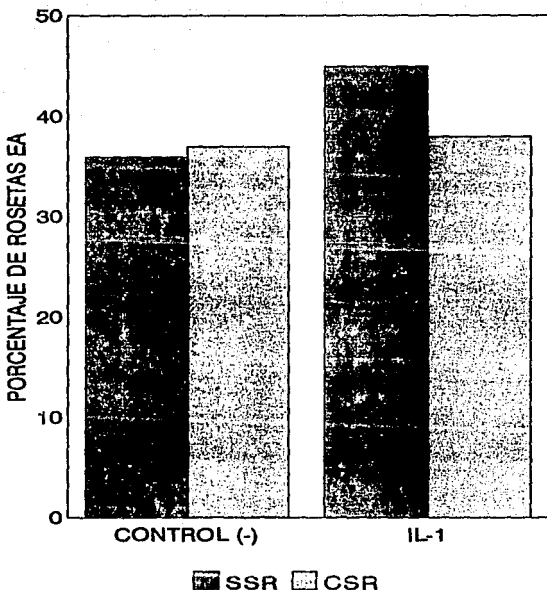


— IL-1 $\beta$  ng/ml

**Gráfica 2.** Curva dosis respuesta de IL-1 $\beta$  en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón. Las células se mantuvieron dos días en presencia o ausencia del inductor.



**Gráfica 3. Inducción de FcR por IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón mantenidos durante dos días en presencia o ausencia de los inductores**  
**Control (-). Control negativo.**  
**IFN- $\gamma$  . Interferón gama 800 U/ml.**  
**IL-1 $\beta$  . Interleucina-1 80 ng/ml.**



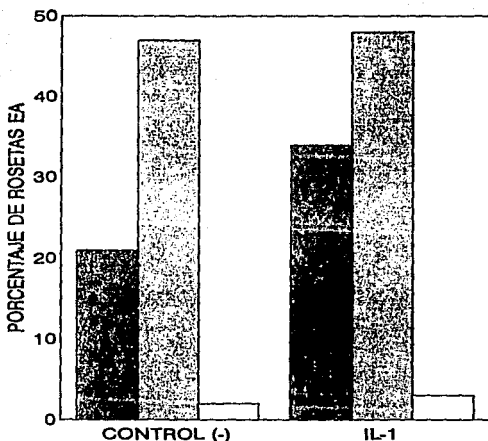
**Gráfica 4. Inhibición de la formación de rosetas con suero de ratón en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón mantenidos durante dos días en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$**

**Control (-).** Control negativo.

**IL-1 $\beta$ .** Interleucina-1 beta.

**SSR.** Sin suero de ratón.

**CSR.** Con suero de ratón.



SIN TRIPSINA Y EA   
  CON TRIPSINA Y EA  
 SIN TRIPSINA Y EC

**Gráfica 5. Aumento de la afinidad de los FcR inducidos en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón por IL-1 $\beta$  después del tratamiento con tripsina.**

**Control (-). control negativo.**

**IL-1 $\beta$  . Interleucina-1 beta.**

**EA. Eritrocitos de carnero activados.**

**EC. Eritrocitos de carnero no activados.**

Para descartar que los EA se adhirieron en forma inespecífica a las células tratadas con tripsina, se realizaron también ensayos donde se emplearon eritrocitos no opsonizados con IgG. En tales experimentos no se detectó formación de rosetas en las células tratadas con o sin tripsina (0%, datos no mostrados), independientemente de si se les había cultivado con o sin IL-1 $\beta$ , lo cual parece indicar que el aumento en el porcentaje de rosetas se debe a un incremento de la afinidad.

**Los anticuerpos monoclonales contra los Fc $\gamma$ R humanos no reconocen los Fc $\gamma$ R inducidos por IL-1 $\beta$  en los macrófagos de ratón, pero se da reacción positiva solo en las células tratadas con IL-1 $\beta$  independientemente del anticuerpo empleado.**

Para determinar si los anticuerpos (ab) diseñados contra los tres tipos de Fc $\gamma$ R humanos podían reconocer los Fc $\gamma$ R de ratón inducidos por IL-1 $\beta$  en los macrófagos, se decidió realizar ensayos de inmunofluorescencia en las células que fueron cultivadas en presencia y ausencia del factor así como en presencia y ausencia de IFN $\gamma$  ya que este inductor ha sido caracterizado como una molécula capaz de inducir la expresión de los Fc $\gamma$ R I y III.

Los resultados indicaron que las células cultivadas sin inductores no presentaban reacción positiva con ninguno de los anticuerpos monoclonales anti-Fc $\gamma$ R, tampoco con el anticuerpo no relacionado o donde sólo se añadió el ab secundario.

De igual forma, los macrófagos estimulados con IFN $\gamma$  no presentaron reacción positiva con ninguno de los anticuerpos. Sin embargo, en las células mantenidas en presencia de IL-1 $\beta$  se obtuvo una reacción positiva de igual intensidad con los 3 anticuerpos contra los receptores Fc $\gamma$ R, así como con el ab no relacionado e incluso donde sólo se usó el ab secundario.

Estos resultados indican una clara diferencia entre los Fc $\gamma$ R inducidos por IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$ .

**Los macrófagos no presentan inmunoglobulinas unidas a sus Fc $\gamma$ R desde el inicio del cultivo.**

Al observar que en las células tratadas con IL-1 $\beta$  se presentaba reacción positiva aún donde sólo se usó el ab secundario, se procedió a descartar la posibilidad de que el ab secundario estuviera reconociendo inmunoglobulinas unidas a los Fc $\gamma$ R desde el inicio del cultivo y que eran mantenidas gracias a algún efecto de aumento de afinidad en los Fc $\gamma$ R por estos anticuerpos causado por la IL-1 $\beta$ . Para ello se desarrollaron ensayos a tiempo cero, en macrófagos que sólo habían sido adheridos durante 2 hrs en medio de cultivo libre de suero y sin inductor.

Los ensayos a tiempo cero mostraron que las células fueron negativas ya sea donde se emplearon los 2 anticuerpos, o donde sólo se empleó el ab secundario (Fotos 1 y 2). Es pues evidente que los macrófagos no presentan IgG unida a sus Fc $\gamma$ R desde el inicio del cultivo y que la reacción positiva no se presenta en ausencia de inductor.

**La fluorescencia en macrófagos tratados con IL-1 no se debe a la presencia de inmunoglobulina de caballo**

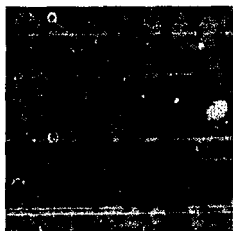
Una vez que se determinó que los macrófagos extraídos de la cavidad peritoneal no presentaban inmunoglobulinas de ratón adheridas a los Fc $\gamma$ R en su membrana al inicio del los cultivos, se decidió realizar experimentos en células mantenidas en medio de cultivo con o sin suero y en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$ , para descartar la posibilidad de que el ab secundario

estuviera reconociendo inmunoglobulinas del suero de caballo adheridas a los macrófagos mediante los Fc $\gamma$ R inducidos por IL-1 $\beta$  durante el experimento.

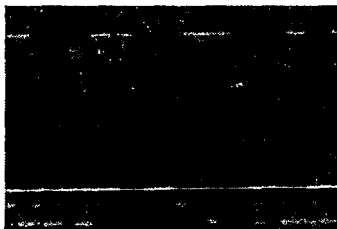
Los resultados indicaron que las células que se cultivaron en medio suplementado con suero de caballo sin IL-1 $\beta$  no presentaron fluorescencia con ningún anticuerpo (fotos 3 y 4), en cambio, la presencia de IL-1 $\beta$  favoreció una reacción positiva independientemente del anticuerpo empleado (fotos 5 y 6).

El resultado más interesante se obtuvo al analizar las fotografías de las células mantenidas en medio de cultivo sin suero. En ellas se puede apreciar que las células que se mantuvieron sin IL-1 $\beta$  no presentaron fluorescencia (fotos 7 y 8). Sin embargo, las células que se cultivaron con IL-1 $\beta$  presentaron reacción positiva (fotos 9 y 10), siendo de mayor intensidad en las células donde sólo se empleó el ab secundario (foto 10).

De esta forma, nuestros resultados indicaron que el anticuerpo secundario no reconoció a las inmunoglobulinas presentes en el suero de caballo, pero sí una molécula inducida por IL-1 en la membrana de los macrófagos de ratón.

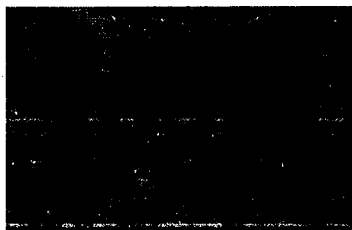


**FOTOGRAFIA 1.** Inmunofluorescencia negativa de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón después de dos horas de extraídos, utilizando anticuerpo primario y secundario, Microscopio de epifluorescencia Olympus, 400 X.



**FOTOGRAFIA 2.** Inmunofluorescencia negativa de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón después de dos horas de extraídos, utilizando anticuerpo secundario, Microscopio de epifluorescencia Olympus, 400 X.

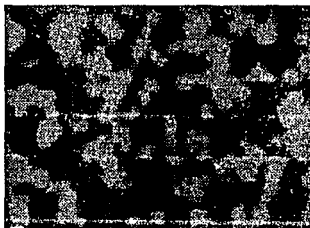




**FOTOGRAFIA 3.** Inmunofluorescencia negativa de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón después de dos días de cultivo en medio suplementado con suero de caballo y ausencia de IL-1 $\beta$ , utilizando anticuerpo primario y secundario, Microscopio de epifluorescencia Olympus, 400 X.



**FOTOGRAFIA 4.** Inmunofluorescencia negativa de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón después de dos días de cultivo en medio suplementado con suero de caballo y ausencia de IL-1 $\beta$ , utilizando anticuerpo secundario, Microscopio de epifluorescencia Olympus, 400 X.



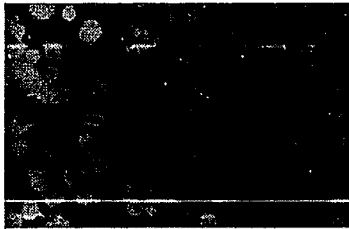
**FOTOGRAFIA 5.** Inmunofluorescencia débilmente positiva de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón después de dos días de cultivo en medio suplementado con suero de caballo e IL-1 $\beta$  (80 ng/ml.), utilizando anticuerpo primario y secundario, Microscopio de epifluorescencia Olympus, 400 X.



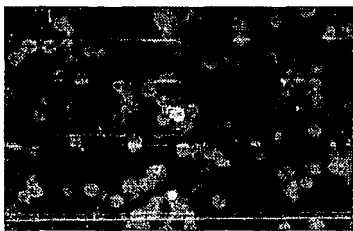
**FOTOGRAFIA 6.** Inmunofluorescencia débilmente positiva de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón después de dos días de cultivo en medio suplementado con suero de caballo e IL-1 $\beta$  (80 ng/ml.), utilizando anticuerpo secundario, Microscopio de epifluorescencia Olympus, 400 X.



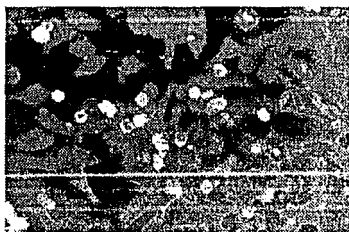
**FOTOGRAFIA 7.** Inmunofluorescencia negativa de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón después de dos días de cultivo en medio libre de suero y sin IL-1 $\beta$ , utilizando anticuerpo primario y secundario, Microscopio de epifluorescencia Olympus, 400 X.



**FOTOGRAFIA 8.** Inmunofluorescencia negativa de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón después de dos días de cultivo en medio libre de suero y sin IL-1 $\beta$ , utilizando anticuerpo secundario, Microscopio de epifluorescencia Olympus, 400 X.



**FOTOGRAFIA 9.** Inmunofluorescencia débilmente positiva de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón después de dos días de cultivo en medio libre de suero y con IL-1 $\beta$  (80 ng/ml), utilizando anticuerpo primario y secundario, Microscopio de epifluorescencia Olympus, 400 X



**FOTOGRAFIA 10.** Inmunofluorescencia positiva de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón después de dos días de cultivo en medio libre de suero y con IL-1 $\beta$  (80 ng/ml), utilizando anticuerpo secundario, Microscopio de epifluorescencia Olympus, 400 X.

## DISCUSION

Los receptores para la porción Fc de la inmunoglobulina G (FcγR) son una parte fundamental de los mecanismos de defensa que posee el organismo contra agentes patógenos. La interacción de los FcγR con inmunoglobulinas acopladas al antígeno (complejos antígeno-anticuerpo) desencadena una gran cantidad de respuestas en las células que los portan entre las que se encuentran la fagocitosis, la ADCC y la liberación de mediadores biológicos (5, 112, 128, 136, 143). Los FcγR son también importantes para la eliminación de complejos inmunes; se piensa que sus formas solubles pueden participar en el control de los niveles de Ig en el suero (5, 134).

A pesar de que los estudios de estas glicoproteínas comenzaron en los 70's todavía es mucho lo que se desconoce acerca de los factores que controlan su expresión, especialmente en el ratón que es por lo general el modelo donde se realizaron las primeras investigaciones antes de comenzar con el humano. Así por ejemplo, nuestro grupo (3, 171) y otros (169) han encontrado que la Interleucina 1 (IL-1) induce la expresión de FcγR en macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón y rata. Sin embargo, aunque en los estudios citados se reporta que IL-1 presenta actividad inductora de FcγR, en ninguno de ellos se ha podido señalar que tipo o tipos de receptores son los que se inducen, ni se han descrito sus características.

En la presente investigación se demuestra que tanto IL-1β como IFNγ inducen la expresión de FcγR, sin embargo los FcγR inducidos por IL-1β son bloqueados en forma considerable por diversos tipos de anticuerpos no específicos, incluyendo los del suero de ratón.

Consideramos que el que se haya presentado un descenso en la formación de rosetas inducidas con IL-1β por anticuerpos no específicos puede ser debido a que este factor induzca receptores de tipo FcγRI el cual tiene alta afinidad por la IgG monomérica (5, 112, 128, 136). Esta gran afinidad por anticuerpos no específicos se ve corroborada por nuestros resultados en donde obtuvimos reconocimiento de anti-FcγRI, II, III y del anticuerpo contra citoqueratina por los FcγR inducidos por IL-1β y no en aquellos inducidos por el IFNγ en los ensayos de inmunofluorescencia. Esta diferencia de reconocimiento nos indica claramente que IL-1β induce receptores diferentes a aquellos inducidos por el IFNγ. Es interesante mencionar que se ha publicado que el IFNγ induce receptores FcγRI (90, 92), sin embargo; nuestros resultados parecen indicar que aquellos inducidos por la IL-1β pudieran tener una mayor afinidad por la porción Fc del IgG. Si IL-1β induce FcγRI la diferencia con los FcγRI inducidos por IFNγ, podría deberse a que se ha publicado que existen 3 diferentes tipos de FcγRI generados de diferentes transcritos cuya expresión depende del estímulo que los induce y de la célula estimulada (136), en consecuencia sería interesante el determinar si la IL-1 pudiera inducir un transcrito diferente al del IFN-γ, esto explicaría la diferencia observada.

Por otra parte, es interesante mencionar el fenómeno de aumento en la afinidad de los FcγR después del tratamiento con tripsina. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la capacidad para hacer rosetas por parte de las células mantenidas sin inductor se incrementa en función del tiempo (3), hecho atribuible a la secreción de un factor capaz de inducir FcγR por parte de los macrófagos (125) cuyas características indican que es IL-1β (125, 126), lo cual nos hace suponer que los FcγR existentes en nuestros controles negativos fueron generados por IL-1β endógena y por tanto se comportan en forma semejante al tratamiento con la tripsina.

Tomando en consideración que se sabe que los Fc $\gamma$ R I y Fc $\gamma$ R III inducidos por IFN $\gamma$  son sensibles a la tripsina (119, 122), la resistencia a esta enzima de aquellos Fc $\gamma$ R inducidos por la IL-1 $\beta$  nos da un dato más sobre la diferencia de los receptores inducidos por estos factores. Sin embargo el hecho sorprendente de que no únicamente fueron resistentes a la tripsina sino que aumentaron drásticamente su afinidad, pudiera indicar que la porción extracelular de este tipo de Fc $\gamma$ R inducido por IL-1 $\beta$  tenga una región sensible al ataque proteolítico que exponga una región que propicie un mejor reconocimiento de la porción Fc del IgG.

Con base en los resultados descritos hasta ahora, pudiera pensarse que IL-1 $\beta$  es capaz de inducir principalmente Fc $\gamma$ R II ya que se sabe que este tipo de receptor es resistente a la tripsina, sin embargo no hay que perder de vista que Fc $\gamma$ R II no tiene gran afinidad por el IgG monomérico como la encontrada en este trabajo para los Fc $\gamma$ R inducidos por IL-1 $\beta$ , lo cual nos estaría indicando que los Fc $\gamma$ R inducidos por este factor podrían pertenecer a un tipo diferente de Fc $\gamma$ R II a los descritos hasta la fecha o bien, como ya se mencionó, ser algún Fc $\gamma$ R I.

Tratando de caracterizar en forma más contundente el tipo de receptor inducido por la IL-1 $\beta$  se emplearon anticuerpos monoclonales contra los Fc $\gamma$ R I, Fc $\gamma$ R II y Fc $\gamma$ R III. Sin embargo es pertinente mencionar que no existen hasta la fecha anticuerpos monoclonales contra este tipo de receptores de ratón, por lo que se emplearon anticuerpos contra receptores humanos. Este experimento se basó en el hecho que los Fc $\gamma$ R de humano presentan una gran homología con los de ratón y por tanto pudiéramos esperar una reacción cruzada.

Nuestros resultados indicaron que los anticuerpos monoclonales contra Fc $\gamma$ R humanos no presentan reactividad con ninguno de los Fc $\gamma$ R de ratón ya que aquellas células que fueron inducidas con IFN $\gamma$  no presentaron reconocimiento con ninguno de los anticuerpos. Es interesante mencionar que como era esperado existió reconocimiento de estos anticuerpos por los Fc $\gamma$ R inducidos por la IL-1 $\beta$  ya que, como explicamos anteriormente, son receptores inespecíficos y por tanto muy probablemente reconocieron la porción Fc de estos anticuerpos.

Sin embargo, es pertinente mencionar que sorprendentemente estos receptores presentaron reacción positiva incluso donde sólo se utilizó la porción F(ab) $_2$  de un anticuerpo secundario generado contra inmunoglobulinas de ratón. Como este anticuerpo carece de la región Fc, el reconocimiento inespecífico es independiente de esta porción.

Considerando que el anticuerpo secundario utilizado reconoce cualquier inmunoglobulina de ratón, una posible explicación del reconocimiento es que los macrófagos extraídos de la cavidad peritoneal presentarían inmunoglobulinas desde un inicio del ensayo y que el papel de IL-1 $\beta$  sólo consistió en mantener este complejo durante el tiempo de cultivo para posteriormente ser reconocida por el anticuerpo secundario.

Los ensayos a tiempo cero donde empleamos el anticuerpo no relacionado contra citoqueratinas más el secundario o sólo el secundario nos indicaron que los macrófagos no tienen inmunoglobulinas unidas en su membrana. Aún cuando los macrófagos presentaron IgG unido a sus membranas en tiempo cero, sería muy difícil afirmar que IL-1 $\beta$  la mantenía adherida a los Fc $\gamma$ R durante los 2 días de cultivo ya que estos receptores están en constante reciclamiento, así por ejemplo, se ha reportado que el 20% de los Fc $\gamma$ R II siempre se encuentra internalizado debido a su reciclaje y regresa a la superficie sin ligando (128).

Otra posible explicación de la fluorescencia observada con el anticuerpo secundario es que este anticuerpo estaba reconociendo inmunoglobulinas de caballo que estuviesen adheridas a los receptores inducidos por IL-1 $\beta$ . Aunque en las células cultivadas con IL-1 $\beta$  en medio suplementado con suero se presentó reacción positiva, ésta fue de mayor intensidad en las células mantenidas en medio de cultivo libre de suero. De esta forma, los ensayos descritos eliminan la posibilidad de que la reacción positiva obtenida con las células tratadas con IL-1 $\beta$  se debiera a que

el ab secundario reconocía inmunoglobulinas propias presentes desde el inicio del cultivo o inmunoglobulinas de caballo que unió durante el experimento.

Con base en estos resultados y considerando que IL-1 $\beta$  provoca formación de rosetas EA pensamos que es muy probable que lo que está reconociendo la porción F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo secundario es el Fc $\gamma$ R inducido por IL-1 $\beta$ . Esto se explica por el hecho de que los receptores Fc presentan dominios del tipo Cy2 de IgG (128), que en nuestro caso particular sería de IgG de ratón. Si este anticuerpo secundario reconoce precisamente los dominios Cy2 de una IgG, es muy probable que reconociera los dominios Cy2 del receptor inducido por IL-1 $\beta$  presentándose la reacción positiva.

Si esta hipótesis es correcta, también nos permite explicar porqué el mayor reconocimiento se presentó en aquellas células donde sólo se empleó el anticuerpo secundario pues se sabe que las IgG usan su dominio Cy2 para enlazarse a sus receptores (121, 135, 137, 172) mientras que por otra parte, los receptores Fc también emplean sus dominios tipo Cy2 para el enlace a su ligando (5, 112, 128, 136, 137). De esta forma, donde no se usa el anticuerpo no relacionado, el anticuerpo secundario tendría acceso libre a los dominios tipo Cy2 del Fc $\gamma$ R dándose el reconocimiento, mientras que cuando se emplea el anticuerpo no relacionado, éste se une al receptor ocupando su propia región Cy2 así como la del receptor, con lo que el secundario no tiene acceso a estas zonas y el reconocimiento disminuye.

En conclusión, los primeros resultados con el suero de ratón indicaban que posiblemente IL-1 $\beta$  induce al Fc $\gamma$ RI, aunque considerando los resultados del tratamiento con tripsina y los de la fluorescencia nos inclinamos por la suposición de que IL-1 induce principalmente Fc $\gamma$ RII.

Si se lograra confirmar que IL-1 $\beta$  induce algún tipo nuevo de Fc $\gamma$ RII nuestros resultados apoyarían a los de Grattage (7), que señala que IL-1 induce Fc $\gamma$ RII, aunque se debe mencionar también que él empleó una línea monocítica leucémica de humano (U-937) y que para detectar el efecto de IL-1 necesitaba emplearla en combinación con ésteres de forbol, ya que por sí sola no indujo Fc $\gamma$ R. Así pues, nuestros resultados serían el primer reporte acerca de que IL-1 $\beta$  por sí sola incrementa la expresión de un tipo novedoso de Fc $\gamma$ RII en macrófagos normales siendo posible detectarlos por sus propiedades de ser inhibidos inespecíficamente por anticuerpos no relacionados, por su respuesta al tratamiento con tripsina y mediante su propiedad de ser reconocidos por la fracción F(ab')<sub>2</sub> de un anticuerpo dirigido contra inmunoglobulinas de ratón, lo que además permite diferenciarlos de los receptores inducidos por IFN $\gamma$ . Sin embargo, para confirmar esto es necesario emplear técnicas de biología molecular y ab monoclonales específicos contra los receptores de ratón ya que por el momento no podemos descartar la posibilidad de que IL-1 $\beta$  sea capaz de inducir a otros tipos de receptores y que bajo nuestras condiciones no los podamos detectar ni tampoco podemos afirmar que lo que reconoce el ab secundario es el un dominio del Fc $\gamma$ RII, aunque esta opción nos parece la más plausible.

¿Que importancia tendría que IL-1 indujera la expresión del Fc $\gamma$ RII en lugar de los tipos I y III inducidos por IFN $\gamma$ ? ¿Por qué el organismo presenta mas de una molécula con capacidad de inducir Fc $\gamma$ R? Las respuestas a estas preguntas parecen aportarlas el hecho de que los Fc $\gamma$ RII son los mas ampliamente distribuidos en todas las células sanguíneas y los estudios acerca de mediación de efectos y transducción de señales por parte de cada receptor (139). Se ha observado que en la línea leucémica U-937 que presenta los receptores tipo I y II se necesita entrecruzamiento de ellos para desencadenar respuestas como movilización de Ca<sup>2+</sup> a partir de reservas intracelulares, hidrólisis de fosfatidil inositol fosfato, fosforilación de tirosina de fosfolipasa C $\gamma$ 1, y que es el Fc $\gamma$ RII quien controla el envío de las señales (117, 173).

En el estudio de Ball (174), el receptor tipo I se encuentra presente en todos los tipos de leucemia mieloide aguda que revisaron, su expresión fue muy rara en aquellas leucemias donde no se expresó el receptor tipo II aunque las implicaciones que esto pudiera tener aún no se conocen,

pero tal vez pudiera ser de relevancia para la transducción de señales y diferenciación de estas células.

La alta afinidad del Fc $\gamma$ RI por IgG monomérica podría provocar que estuviese ocupado *in vivo* por lo que las funciones defensivas recaerían en los otros 2 receptores (134).

En los neutrófilos que presentan los receptores II y III éste último receptor está anclado por GPI y no es capaz de desencadenar respuesta a menos que se presente entrecruzamiento con el receptor tipo II si bien el Fc $\gamma$ RIII no regula las señales generadas por el tipo II, puede necesitar de él para transducir las suyas, siendo la prueba mas clara de ello que el enlace de un ab contra el Fc $\gamma$ RIII inhibe completamente las señales inducidas por Fc $\gamma$ RIII. Con esto se reforza la hipótesis de que el alto número de Fc $\gamma$ RIII tiene la finalidad de servir como trampa para las IgG permitiendo al Fc $\gamma$ RII entrar en acción (173).

En aquellos individuos sanos que no presentan Fc $\gamma$ RIII en sus neutrófilos, así como en aquellos cuyos monocitos carecen de Fc $\gamma$ RI (128, 138), una posible explicación es que no necesitan de ellos ya que el Fc $\gamma$ RII puede activar los mecanismos de defensa. De esta forma, parece que es el Fc $\gamma$ RII quien se encarga de la mediación de señales al darse el enlace con IgG tanto en macrófagos como en granulocitos.

Finalmente, si IL-1 $\beta$  pudiese incrementar la expresión del Fc $\gamma$ RII, reforzaría la idea de emplear esta molécula en la terapia de pacientes con diversos padecimientos ya sea sola o combinada con otros factores y donde se ha demostrado que los niveles de Fc $\gamma$ R son importantes, por ejemplo en células mononucleadas de pacientes con carcinomas, cáncer de mama y enfermedades linfoproliferativas donde se ha reportado que el alto nivel de Fc $\gamma$ R se relaciona con la supervivencia y la sobrevida libre de enfermedad (175). En aquellos pacientes que presentan los tumores más grandes, los niveles de los receptores son bajos (175), lo cual podría deberse a la supresión del sistema inmune que se presenta en estadios avanzados de cáncer y que tal vez podría corregirse en cierta medida con la administración de IL-1 (175).

Sin embargo, tampoco se debe olvidar que IL-1 controla una gran cantidad de efectos, algunos de ellos bastante nocivos para el organismo (35, 38), por lo que se deben continuar los estudios para conocer los pros y contras de administrarla. Así por ejemplo, con respecto al papel de los Fc $\gamma$ R que IL-1 pudiera inducir bajo ciertos esquemas terapéuticos se debe tener presente que estos receptores pueden actuar como ruta de entrada para ciertos agentes infecciosos como el virus del dengue o el del SIDA (176), por lo cual es importante comprender los mecanismos que permiten a cada Fc $\gamma$ R desempeñar sus funciones defensivas y bajo que condiciones actúan como ruta de acceso a los agentes patógenos así como todos los procesos mediados por ellos.

Es en ésta tarea en la que los modelos donde se emplean organismos como el ratón son de una gran utilidad. De esta forma, algunas de las perspectivas del presente trabajo son:

Emplear otras pruebas para determinar el tipo de receptor Fc inducido por IL-1 $\beta$  como detección de mRNA a través del ensayo de Southern Blot utilizando sondas de oligonucleótidos diseñadas según las secuencias reportadas para cada receptor o con cDNA completo que haya sido clonado en bacterias.

Ya que la detección del mRNA no garantiza la expresión de la proteína para la que codifica sobre la superficie celular se considera pertinente diseñar anticuerpos monoclonales específicos contra los receptores de ratón en alguna especie animal como rata, cobayo, conejo o hámster. De igual forma, es necesario obtener un anticuerpo secundario contra la IgG del organismo en que se desarrolle el ab. primario que si bien puede ser policlonal, reconozca exclusivamente IgG. A los anticuerpos contra los receptores Fc así como al secundario se les debe tratar con papaina o pepsina para eliminar su región Fc y de esta forma evitar la reacción inespecífica.



Se recomienda también el empleo de un sistema de FACS (Fluorescein Activated Cell Sorter) para registrar la fluorescencia en forma cuantitativa y no sólo cualitativa. Se recomienda este sistema en lugar de un citómetro de flujo ya que, gracias a su capacidad de separar las células fluorescentes de las que no lo son, nos permitiría purificar las poblaciones con las que se desarrollarán nuestros experimentos, evitando posibles interferencias y alteraciones de los resultados debidas a los otros tipos celulares.

## CONCLUSIONES

Los receptores inducidos por IL-1 $\beta$  en los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón son resistentes y se vuelven más afines a la formación de rosetas después del tratamiento con tripsina, lo que hace suponer que se trata de Fc $\gamma$ RII, aunque no se descarta la posibilidad de que ésta molécula induzca al Fc $\gamma$ RI considerando la afinidad por las IgG monoméricas.

Los anticuerpos monoclonales contra Fc $\gamma$ R de humano no presentan reactividad con los Fc $\gamma$ R de ratón.

El reconocimiento que se presenta sobre células tratadas con IL-1 $\beta$  se debe a una reacción específica del ab secundario con alguna molécula que es inducida por la IL-1 $\beta$  y que muy probablemente es el Fc $\gamma$ RII ya que la fluorescencia no se presenta sobre células tratadas con IFN $\gamma$ , que induce Fc $\gamma$ RI y III.

Las evidencias presentadas parecen indicar que IL-1 induce un receptor para Fc diferente a los inducidos por IFN $\gamma$  y que podría tratarse del Fc $\gamma$ RII.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Kelley J. (1990). Cytokines of the Lung. *J. Am. Rev. Resp. Dis.* 141:765-788.
- 2) Dinarello C. A. (1992). The Biology of Interleukin-1. *In* Kishimoto T (ed). *Interleukins: Molecular Biology and Immunology*. Chem. Immunol. Karger. Switzerland. p.1-32
- 3) Flores B. F. (1991). Inducción a la Expresión de Receptores Fc en Macrófagos y Granulocitos de Ratón por Interleucina 1 Recombinante Humana. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza. U. N. A. M.
- 4) Valencia M. E. (1992). Evaluación del Efecto Inductor a la Expresión de Receptores Fc en la Línea Leucémica Monocítica Humana U-937 por Tres Diferentes Modificadores Biológicos. Reporte de Servicio Social. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza. U. N. A. M.
- 5) Van de Winkel J. G. J. and C. L. Anderson. (1991). Biology of Human Immunoglobulin G Fc Receptors. *J. Leuk. Biol.* 49:511-524.
- 6) Arend W. P., Ammons J. T. and B. L. Koltzin. (1987). Lipopolysaccharide and Interleukin 1 Inhibit Interferon- $\gamma$  Induced Fc Receptor Expression on Human Monocytes. *J. Immunol.* 139:1873-1879.
- 7) Grattage L. P., McKenzie I. F. and P. M. Hoggarth. (1992). Effects of PMA, Cytokines and Dexametasone on the Expression of Cell Surface Fc Receptors and mRNA in U937 Cells. *Immunol. Cell. Biol.* 70:97-105.
- 8) Foxwell B. M. J., Barrett K. and M. Feldman. (1992). Cytokine Receptors: Structure and Signal Transduction. *Clin. Exp. Immunol.* 90:161-169.
- 9) Bade G. and G. S. Ilabitch. (1991). Primitive Cytokines: Harbingers of Vertebrate Defense. *Immunol. Today.* 12:180-183.
- 10) Watanabe Y., Kitamura T., Hayashida K. and A. Miyajima. (1992). Monoclonal Antibody Against the Common  $\beta$  Subunit ( $\beta$ c) of the Human Interleukin 3 (IL-3), Interleukin 5 (IL-5) and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptors Shows Upregulation of  $\beta$ c by IL-1 and TNF $\alpha$ . *Blood.* 80:2215-2220.
- 11) Linnenkin D., Park L. S. and W. L. Farrar. (1992). Dissociation of Human Cytokine Expression and Signal Transduccion. *Blood.* 80:1896-1904.
- 12) Dexter M. T. (1987). Growth Factors Involved in Hematopoiesis. *J. Cell. Sci.* 88:1-6.
- 13) Canistra S. A. and J. D. Griffin. (1988). Regulation of the Production of Granulocytes and Monocytes. *Semin. Hematol.* 25:173-188.
- 14) Dexter T. M., Heyworth C. M., Spooncer E. and I. L. O. Pointing. (1990). The Role of Growth Factors in Self-Renewal and Differentiation of Haemopoietic Cells. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 327:85-98.

- 15) Till J. E. and E. A. McCulloch. (1961). A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiat. Res.* 14:215-222.
- 16) Metcalf D. (1988). *The Molecular Control of Blood Cells*. Harvard Univ. Press. USA. p 12-21.
- 17) Curry J. L. and J. J. Trentin. (1967). Hemopoietic Spleen Colony Studies. 1. Growth and Differentiation. *Devl. Biol.* 15:395-413.
- 18) Storb B. T. (1988). Cellular Interactions. *Blood.* 72:373-385.
- 19) Burgess A. W. (1985). Hematopoietic Growth Factors in Mediators in Cell Growth and Differentiation. Ford R. J. and A. L. Maizel. (eds). Raven Press. USA. p. 159-169
- 20) Morse E. E. (1989). Factors Involved in the Regulation of Hematopoiesis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 19:65-69.
- 21) Klingeman H. G. and C. J. Eaves. (1988). Colony Stimulating Factors. *Bone Marrow Transplantation* 3:177-184.
- 22) Taketazu F., Chiba S., Shibuya K., Kuwaki T., Tsumura H., Miyazono K., Miyagawa K. and T. Fumimaro. (1991). IL-3 Specifically Inhibits GM-CSF Binding to the Higher Affinity Receptor. 146:251-257.
- 23) Walker F., Nicola N. A., Metcalf D. and A. W. Burgess. (1985). Hierarchical Down-Modulation of Hematopoietic Growth Factor Receptors. *Cell.* 43:269-275.
- 24) Liboi E., Jubinski P., Andrews N., Nathan D. and B. M. Preust. (1992). Enhanced Expression of Interleukin-3 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor Subunits in Murine Hematopoietic Cells Stimulated with Hematopoietic Growth Factors. *Blood.* 80:1183-1189.
- 25) Onge J. S. and R. J. Jacobson. (1992). The Role of Hematopoietic Growth Factors in the Treatment of Neoplastic Diseases. *Semin. Hematol.* 29:53-63.
- 26) Cosman D. (1988). Colony Stimulating Factors *In Vivo* and *In Vitro*. *Immunol. Today.* 9:97-98.
- 27) Bussolino F., Wang J. M., Defilippi P., Turrini F., Sanavio F., Edgell C. J. S., Aglietta M., Arese P. and A. Mantovani. (1989). Granulocyte- and Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factors Induce Human Endothelial Cells to Migrate and Proliferate. *Nature.* 337:471-473.
- 28) Hogg N. (1986). Factor-Induced Differentiation and Activation of Macrophages. *Immunol. Today.* 7:65-66.
- 29) Tweardy D. J., Anderson K., Cannizzaro L., Steinman K. A., Croce C. M. and K. Huebner. (1992). Molecular Cloning of cDNAs for the Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor from HL-60 and Mapping of the Gene to Chromosome Region 1p32-34. *Blood.* 79:1148-1154.

- 30) Shieh J. H., Peterson R. H. F. and M. A. S. Moore. (1991). Modulation of Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptors on Murine Peritoneal Exudate Macrophages by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *J. Immunol.* 146:2648-2653.
- 31) Horiguchi J., Sariban E. and D. Kufe. (1988). Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of CSF-1 Gene Expression in Human Monocytes. *Mol. Cell. Biol.* 8:3951-3954.
- 32) Kawasaki E. and M. Ladner. (1990). Molecular Biology of Macrophage Colony Stimulating Factor in Colony Stimulating Factors, Molecular and Cellular Biology. M. T. Dexter (ed). Marcel Dekker Inc. USA. p. 155-176.
- 33) Cheung D. L. and J. A. Hamilton. (1992). Regulation of Human Monocyte DNA Synthesis by Colony Stimulating Factors, Cytokines and Cyclic Adenosine Monophosphate. *Blood.* 79:1972-1981
- 34) Becker S., Warren M. K. and S. Haskill. (1987). Colony Stimulating Factor Induced Monocyte Survival and Differentiation into Macrophages in Serum Free Cultures. *J. Immunol.* 139:3703-3709.
- 35) Dinarello C. A. (1991). Interleukin-1 and Interleukin-1 Antagonism. *Blood.* 77:1627-1652.
- 36) Schindler R. and Dinarello C. A. (1990). Interleukin 1. In Habenicht A. (ed). Growth Factors, Differentiation Factors, and Cytokines. Springer Verlag, Germany. p 85-102.
- 37) Dinarello C. A. (1989). Was the Original Endogenous Pirogen Interleukin-1. In Bomford R. and B. Henderson (eds). Research Monographs in Cell and Tissue Physiology V16. Interleukin-1, Inflammation and Disease. Elsevier Publishing Co. USA. p 17-46.
- 38) Bagby Jr. G. C. (1989). Interleukin-1 and Hematopoiesis. *Blood Reviews.* 3:150-161.
- 39) Aarden L. A., Brunner T. K., Cerettini J. C., Dayer J. M., DeWeck A. L., Dinarello C. A., Di Sabato G., Farrar J. J., Gery I., Gillis S., Handschumacher R. E., Henning C. S., Hoffman M. K., Koopman W. J., Krane S. M., Lachman L. B., Lefkowitz I., Mischeil R. I., Mizel S. B., Oppenheim J. J., Paetken V., Plate J., Rollinghoff M., Shimpl A., Simon P. L., Smith K. A., Wagner H., Watson J. D., Wecker E., and D. D. Wood. (1979). Revised Nomenclature for Antigen-Nonspecific T Cell Proliferation and Helper Functions (letter). *J. Immunol.* 123:2928-2929.
- 40) Fibbe W. E., Schafsma M. R., Falkenburg J. H. F. and R. Willenz. (1989). The Biological Activities of Interleukin 1. *Blut.* 59:147-156.
- 41) Webb A. C., Collins K. L., Auron P. E., Eddy R. L., Nakai H., Byers M. G., Haley L. L., Henry W. M. and T. B. Shows. (1986). Interleukin 1 Gene (IL-1) Assigned to Long Arm of Human Chromosome 2. *Lymphokine Res.* 5:77-81.
- 42) Latage M., Maroc M., Dubreil P., Malcfigt R., Pebusque M., Carcassono Y. and P. Mannoni. (1989). The Human Interleukin-1 $\alpha$  Gene is Located on the Long Arm of Chromosome 2 at Band q13. *Blood.* 73:104-107.

- 43) Lomedico P. T., Gubler U., Hellman C. P., Dukovich M., Giri J. G., Pan Y. C. E., Collier K. Semionov R., Chua A. O., Mizel S. B. (1984). Cloning and Expression of Murine Interleukin-1 cDNA in *Escherichia coli*. Nature 312:458-462.
- 44) Auron P.E., Webb A.C., Rosenwasser L. J. Mucci S. F. Rich A., Wolff S. M., Dinarello C. A. (1984). Nucleotide Sequence of Human Monocyte IL-1 Precursor cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:7907-7911.
- 45) March C. J., Mosley B., Larsen A., Cerreti D. P., Braodt G., Price V., Gillis C. S., Honney S. R., Kronheim K., Grabstein P. J., Conlon P.J., Hopp T. P. Cosman D. (1985). Cloning, Sequence and Expression of Two Distinct Human Interleukin-1 Complementary DNAs. Nature. 315:641-647.
- 46) Gray P. W., Glaister D., Chen E., Goeddel D. V. and D. Pematic. (1986). Two Interleukin 1 Genes in the Mouse: Cloning and Expression of the cDNA for the Murine Interleukin 1 $\beta$ . J. Immunol. 137:3644-3648.
- 47) Hopkins S. J. and M. Humpfrey. (1989). Simple, Sensitive and Specific Bioassay of Interleukin-1. J. Immunol Meth. 120:271-276.
- 48) Tron V. A., Harley C. B., Caussy D and D. N. Sauder. (1988). *In Situ* Detection of Interleukin-1 mRNA in Human Monocytes. Mol. Immunol. 25:439-445.
- 49) Suttles J., Gird J. G. and S. B. Mizel. (1990). IL-1 Secretion by Macrophages. J. Immunol. 144:175-182.
- 50) Chensue S. W., Shmur F. C., Otternes I. G. and S. L. Kunkel. (1981). The  $\beta$  Form is the Dominant IL-1 Released by Murine Peritoneal Macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. 160:1347-1354.
- 51) Sone S., Okubo A. and T. Ogura. (1989). Normal Human Alveolar Macrophages Have More Ability than Blood Monocytes to Produce Cell-Associated Interleukin-1-Alpha. J. Am. Respir. Cell Mol. Biol. 1:507-515.
- 52) Quill H., Gaur A., Brown D., Infante A. J. and R. P. Phillips. (1989). Synergistic Activation of GM-CSF Production by IL-1 and IL-2 in Murine Th1 Cells. J. Immunol. 143:2242-2247.
- 53) Parker K. P., Benjamin W. R., Kaffka K. L. and P. L. Kilian. (1989). Presence of IL-1 Receptors on Human and Murine Neutrophils. J Immunol. 147:537-542.
- 54) Urdal D. L., Call S. M., Jackson J. L. and S. K. Dower. (1988). Affinity Purification and Chemical Analysis of the Interleukin-1 Receptor. J. Biol. Chem. 263:2870-2877.
- 55) Sims J. E., March C. J., Cosman D., Widner M. B., McDonald H. R., McMahan C. J., Grubin C. E., Wignall J. M., Jackson J. L., Call S. M., Gillis S. and S. K. Dower. (1988). cDNA Expression Cloning of the IL-1 Receptor, a Member of the Immunoglobulin Superfamily Science. 241:585-590.

- 56) Dower S. K., Sims J. E., Ceretti D. P. and T. A. Bird. (1992). The Interleukin-1 System: Receptors, Ligands and Signals. *In* Kishimoto T (ed): Interleukins: Molecular Biology and Immunology. Chem. Immunol. Karger, Switzerland. p. 33-64.
- 57) Dubois C. M., Ruscetti F. M., Keller J. R., Oppenheim J. J., Hestdal R., Chizzonite R and R. Neta. (1991). *In vivo* Interleukin 1 (IL-1) Administration Indirectly Promotes Type II IL-1 Receptor Expression on Hematopoietic Bone Marrow Cells. Novel Mechanism for the Hematopoietic Effects of IL-1. *Blood*. 78:2841-2847.
- 58) Symons J. A., Eastgate J. A. and G. W. Duff. (1991). Purification and Characterization of a Novel Soluble Receptor for Interleukin 1. *J. Exp. Med.* 174:1251-1254.
- 59) Chandrasekar S and A. K. Harvey. (1989). Induction of Interleukin 1 Receptor on Chondrocytes by Fibroblast Growth Factor: A Possible Mechanism for Modulation of Interleukin-1 Activity. *J. Cell Physiol.* 138:236-246.
- 60) Rossi B. (1993). IL-1 Transduction Signals. *Eur. Cyt. Netw.* 4:181-187.
- 61) Mizel S. B. (1990). Cyclic AMP and Interleukin 1 Signal Transduction. *Immunol. Today.* 11:390-391.
- 62) O'Neill L. A. J., Bird T. A. and J. Saklatvala. (1990). Interleukin 1 Signal Transduction. *Immunol. Today.* 11:392-393.
- 63) Kooten C. Rensik I., Salcedo D. P., Van Oers R. and L. Aarden. (1991). Monokine Production by Human T Cells; IL-1 $\alpha$  Production Restricted to Memory T Cells. *J. Immunol.* 146:2654-2658.
- 64) Cozzolino F., Rubartelli A., Aldinucci D., Sitia R., Torcia M., Shaw A., R. D. Guglielmo. (1989). Interleukin 1 as an Autocrine Growth Factor for Acute Myeloid Leukemia Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:2369-2373.
- 65) Tazi A., Crestani F. and R. Dantzer. (1990). Aversive Effects of Centrally Injected Interleukin-1. *Neurosci. Res. Comm.* 7:159-165.
- 66) Oster W., Brach M. A., Gruss H. J., Mertelsmann R. and F. Hermann. (1992). Interleukin-1 $\beta$  Expression in Human Blood Mononuclear Phagocytes is Differentially Regulated by Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), M-CSF and IL-3. *Blood*. 79:1260-1265.
- 67) Bacle F., Cavallion N., Lande M., Couturier C. and M. C. Kazatchkine. J. (1990). Induction of IL-1 Release Through Stimulation of the C3b/C4b Complement Receptor Type One (CR1, CD35) on Human Monocytes. *Immunol.* 144:147-152.
- 68) Zimecki M., Wiecek Z., Kapp J. A. and C. W. Pierce. (1988). Secretion of Interleukin 1 (IL-1) by Peritoneal Macrophages upon Contact with Syngenic T Cells is IA-Restricted and Antigen-Independent Process. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis.* 36:661-671.
- 69) Arend P. W., Massoni R. J., Niemann M. A. and P. C. Giclas. (1989). Absence of Induction of IL-1 Production in Human Monocytes by Complement Fragments. *J. Immunol.* 142:173-178.

- 70) Rydgvay D., Borzy M. S. and G. C. Bagby. (1988). Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Activity Production by Cultured Human Thymic Nonlymphoid Cells is Regulated by Endogenous Interleukin-1. *Blood*. 72:1230-1236.
- 71) Lotem J. and L. Sachs. (1988). *In Vivo* Control of Differentiation of Myeloid Leukemic Cells by Cyclosporine A and Recombinant Interleukin-1 $\alpha$ . *Blood*. 72:1595-1601.
- 72) Ramos E. W., Dower S. K. and R. Ross. (1989). Interleukin-1 Mitogenic Activity for Fibroblasts and Smooth Muscle Cells is Due to PDGF-AA. *Science* 243:393-396.
- 73) Moreb J., Zucali J., Grass M. and R. S. Weiner. (1989). Protective Effects of IL-1 on Human Hematopoietic Progenitor Cells Treated *In Vitro* with 4-Hydroxiperoxiciclofosfamide (4HC). *J. Immunol.* 142:1937-1942.
- 74) Watanabe Y., Lee J and A. C. Allison. (1990). Control of the Expression of a Class II Major Histocompatibility Gene (HLA-DR) in Various Human Cell Types: Down Regulation by IL-1 but not by IL-6, Prostaglandin E $_2$  or Glucocorticoids. *Scand. J. Immunol.* 32:601-609.
- 75) Reed S. G., Phil D. N., Conlon P. J. and K. H. Grubstein. (1989). Role of T Cells in the Augmentation of Specific Antibody Production by Recombinant Human IL-1 $\alpha$ . *J Immunol.* 142:3129-3123.
- 76) Williams D. E. and H. E. Broxmeyer. (1988). Interleukin-1 $\alpha$  Enhances the *In Vitro* Survival of Purified Murine Granulocyte-Macrophage Progenitor Cells in the Absence of Colony Stimulating Factors. *Blood*. 72:1608-1615.
- 77) Fibbe W. E., Gosdink H. M., Eeden G., Van Damme J., Billiau A., Voogt P. J., Willemze R., and J. H. F. Falkenburg. (1988). Proliferation of Myeloid Progenitor Cells in Human Long Term Bone Marrow Culture is Stimulated by Interleukin-1 Beta. *Blood*. 72:1242-1247.
- 78) Warren D. J. and M. A. S. Moore. (1988). Synergism among Interleukin 1, Interleukin 3 and Interleukin 5 in the Production of Eosinophils from Primitive Hemopoietic Stem Cells. *J. Immunol.* 140:94-99.
- 79) Dorshkind K. (1988). Interleukin-1 Inhibition of B Lymphopoiesis is Reversible. *Blood*. 72:2053-2055.
- 80) Bensimon C., Wakasugi N., Tanaga Y., Takakura K., Yodoi J., Tursz T and H. Wakasugi. (1989). Two Distinct Affinity Binding Sites for IL-1 on Human Cell Lines. *J. Immunol.* 143:1168-1174.
- 81) Bertho J. M., Fourcade C., Dalloul A. H., Debrw P. and M. D. Mossalay. (1991). Sinergistic Effects of Interleukin 1 and Soluble CD23 on the Growth of Human CD4 Bone Marrow Derived T Cells. *Eur. J. Immunol.* 21:1073-1076.
- 82) Van der Meer J. W. M., Helle M. and L. Aarden. (1989). Comparison of the Effects of Recombinant Interleukin 6 and Recombinant Interleukin 1 on Nonspecific Resistance to Infection. *Eur. J. Immunol.* 19:413-416.

- 83) Van der Schoot E., Jansen P., Poorter M., Wester M. K., Albert E. G. B., Aarden L. A. and R. H. J. van Oers. (1989). Interleukin-6 and Interleukin-1 Production in Acute Leukemia with Monocytoid Differentiation. *Blood*.74:2081-2087.
- 84) Rambaldi A., Torcia M., Bettoni S., Vannier E., Barbui T., Shaw A. R., Dinarello C. and Cozzolino F. (1991). Modulation of Cell Proliferation and Cytokine Production in Acute Myeloblastic Leukemia by Interleukin-1 Receptor Antagonist and Lack of its Expression by Leukemic Cells. *Blood*. 78:3248-2353.
- 85) Eisenberg S. P., Evans R. J. Arend W. P., Verderber E. Brewer M. T., Hannum C. H. and R. C. Thompson. (1990). Primary Structure and Functional Expression from Complementary cDNA of a Human Interleukin-1 Receptor Antagonist. *Nature*. 343:342-346.
- 86) Borth W., Scheer B., Urbansky A., Luger T. and L. S. Jensen. (1990). Binding of IL-1 $\beta$  to  $\alpha$  Macroglobulins and Release by Thioredoxin. *J. Immunol*. 145:3747-3754.
- 87) Svenson M., Poulsen M. K., Fomsgaard A., K Bendteen. (1989). IgG Autoantibodies Against Interleukin 1 $\alpha$  in Sera of Normal Individuals. *Scand. J. Immunol*. 29:489-492.
- 88) Kuzrock K., Talpaz M., Guttermaaj U. (1991). Interferons. In De vita B., Hollman S. and Rosenber S. (eds). *Biologic Therapy of Cancer*. Lippincot Co. USA. p. 247-274.
- 89) Politis A. D. and Vogel S. N. (1990). Pharmacologic Evidence for the Requirement of Protein Kinase C in IFN-Induced Macrophage Fc $\gamma$ R and Ia Antigen Expression. *J. Immunol*. 145:3788-3795.
- 90) Perussia B., Dayton E. T., Lazarus R., Fanning V. and G. Trinchieri. (1983). Immune Interferon Induces the Receptor for Monomeric IgG on Human Monocytic and Myeloid Cells. *J. Exp. Med*. 158:1092-1113.
- 91) Halleck M., Lopisto E. M., Slattery K. E., Griffin J. E. and T. J. Ernst. (1992). Interferon- $\gamma$  Increases the Expression of the Gene Encoding the  $\beta$  Subunit of the Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor. *Blood*. 80:1736-1742.
- 92) Perussia B., Kobayashi M., Rossi M. E., Anegon I. and G. Trinchieri. (1987). Immune Interferon Enhances Functional Properties of Human Granulocytes: Role of Fc Receptors and Effect of Lymphotoxin, Tumor Necrosis Factor and Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor. *J. Immunol*. 138:765-774.
- 93) Becker S. (1984). Interferons as Modulators of Human Monocyte-Macrophage Differentiation I. Interferon  $\gamma$  Increases HLA-DR Expression and Inhibits Phagocytosis of Zymosan. *J. Immunol*. 132:1249-1253.
- 94) Mosser D. M. and E. Handman. (1992). Treatment of Murine Macrophages with Interferon  $\gamma$  Inhibits Their Ability to Bind *Leishmania* Promastigotes. *J. Leuk. Biol*. 52:369-376.



- 95) Brummer E., Kurita N., Yoshida S., Nishimura K. and M. Miyaji. (1991). Killing of *Histoplasma capsulatum* by  $\gamma$ -Interferon-activated Human Monocyte-Derived Macrophages: Evidence for a Superoxide Anion-Dependent Mechanism. *J. Med. Microbiol.* 35:29-34.
- 96) Weinberg B. and J. W. Larrick. (1987). Receptor-Mediated Monocytoid Differentiation of Human Promyelocytic Cells. *Blood.* 70:994-1002.
- 97) Capsoni F., Mionzio F., Ongari A. M., Colombo G., Rizzardi G. P., Bonara P., Monforte A. D. and C. Zanussi. (1992). Increased Expression of IgG Fc Receptor Type I on Neutrophils and Monocytes from HIV-Infected Subjects. *Clin. Exp. Immunol.* 90:175-180.
- 98) Lowry P. A. and P. J. Quesenberry. (1992). Overview of Haematopoiesis. *In* Symann M., P. J. Quesenberry and G. Morstyn (eds). *Haematopoietic Growth Factors*. Gardiner Cadwell Communications. U. K. p. 9-15.
- 99) Lotem J., Shabo Y and L. Sachs. (1991). The Network of Hemopoietic Regulatory Proteins in Myeloid Cell Differentiation. *Cell Growth and Differentiation.* 2:421-427.
- 100) Klein J. (1990). *Immunology*. Blackwell Sci. Co. Cambridge, Mass. USA. p. 8-28, 102-160.
- 101) McNeil P. L., Swanson J. A., Wright D., Silverstein S. C. and D. L. Taylor. (1986). Fc Receptor Mediated Phagocytosis Occurs in Macrophages without and Increase in Average  $Ca^{+2}$ . *J. Cell Biol.* 102. 1586-1592.
- 102) Simon S. I. and W. S. S. Geert. (1988). Biophysical Aspects of Microsphere Engulfment by Human Neutrophils. *Biophys. J.* 53:163-173.
- 103) Daems W. T. Peritoneal Macrophages (1980). *In* The Reticuloendothelial System. VI. Carr I. and W. T. (eds). Plenum Publishing Co. USA. p. 57-127.
- 104) Tripathi A. K., Taplits M., Puri J. and T. Hoffman. (1991). Down Regulation of Surface FcRI and Decrease in Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity of Cultured Monocytes. *J. Immunol.* 146:1309-1315.
- 105) Mantovani A., Bottazzi B., Colotta F., Sozzani S. and L. Ruco. (1992). The Origin and Function of Tumor Associated Macrophages. *Immunol. Today.* 13:265-270.
- 106) Abbas A. K., Litchman A. H. and J. S. Pober. (1991). Cellular and Molecular Immunology. W. B. Saunders Co. USA. p. 37-68.
- 107) Jeske D. J. and J. D. Capra. (1984). Immunoglobulins: Structure and Function. *In* Paul W. E. (ed). *Fundamental Immunology*. Raven Press. USA. p. 131-166.
- 108) Kinet J. P. (1989). Antibody Cell Interactions: Fc Receptors. *Cell* 57:351-54.
- 109) Fridman W. H., Santes C. N., Daeron M., Yodoi J., Brezin C., Vaquero C., Gelibert M. J. and J. Theze. (1984). Induction of Fc Receptors and Immunoglobulin-Binding Factors in T Cell Clones. *J. Mol. Immunol.* 21:1243-1251.

- 110) Gosselin E. J., Wardwell K., Gosselin D. K., Alter N., Fisher J. and P. M. Guyre. (1992). Enhanced Antigen Presentation Using Human Fcγ Receptor (Monocyte-Macrophage) Specific Immunogens. *J. Immunol.* 149:3477-3481.
- 111) Sato H., Nakamura T. and J. Koyama. (1989). Relative Abilities of Two Fcγ Receptors on Guinea Pig Macrophages to Operate in the Phagocytosis of Immune Complexes. *Mol. Immunol.* 26:309-317.
- 112) Ravetch J. V. and J. P. Kinet. (1991). Fc Receptors. *Ann. Rev. Immunol.* 9:457-492.
- 113) Alber G., Kent U. M. and H. Metzger. (1992). Functional Comparison of FcεRI, FcγRII and FcγRIII in Mast Cells. *J. Immunol.* 149:2428-2436.
- 114) Hibbs M. L., Classen B. J., Walker I. D., McKenzie I. D. and P. M. Hoggart. (1988). The Structure of the Murine Fc Receptor for IgG. *J. Immunol.* 140:344-350.
- 115) Mannhalter J. W., Wolf H. M., Ahmad R. and M. M. Eibl. (1986). The Effect of Fc Receptor Modulation on Human Monocyte Function. *Mol. Immunol.* 23:1225-1229.
- 116) Ferberman R. B., Bertran S., Haskill J. S., Nunn M., Holden H. T. and W. H. West. (1977). Fc Receptors on Mouse Effector Cells Mediating Natural Cytotoxicity Against Tumor Cells. *J. Immunol.* 115:322-325.
- 117) Rankin B. M., Yocum S. A., Mittler R. and P. A. Kiecer. (1993). Stimulation of Tyrosine Phosphorylation and Calcium Mobilization by Fcγ Receptor Cross-linking. *J. Immunol.* 150:605-616.
- 118) Mellman J. J. and J. C. Unkless. (1980). Purification of a Functional Mouse Fc Receptor Through the Use of a Monoclonal Antibody. *J. Exp. Med.* 152:1048-1069.
- 119) Unkless J. C. and H.N. Einsen. (1975). Binding of Monomeric Immunoglobulins to Fc Receptors of Mouse Macrophages. *J. Exp. Med.* 142:1520-1533.
- 120) Heusser C. H., Anderson C. L. and H. W. Grey. (1977). Receptors for IgG: Subclass Specificity of Receptors on Different Mouse Cell Types and the Definition of Two Distinct Receptors on a Macrophage Cell Line. *J. Exp. Med.* 145:1316-1327.
- 121) Lane B. C., Mitchel K. J., Titchel M. S. and S. M. Cooper. (1980). Structural Evidence for Distinct IgG Subclass-Specific Fc Receptors on Mouse Peritoneal Macrophages. *J. Exp. Med.* 152:1147-1161.
- 122) Denhams S., Barfoot R. and E. Jackson. (1987). A Receptor for Monomeric IgG2b on Rat Macrophages. *Immunology.* 62:769-74.
- 123) Guyre P. M., Crabtree G. R., Bodwell J. E. and A. Munk. (1981). MLC-Conditionated Media Stimulate an Increase in Fc Receptors on Human Macrophages. *J. Immunol.* 126:666-668.

- 124) Takeda K., Minowada J. and A. Bloch. (1983). Differential Ability of Mitogen-Stimulated Human Leukocyte-Conditionated Media to Induce Fc Receptors on Human Leukemic Cells. *Cell. Immunol.* 79:288-297.
- 125) Calcagno M., Pérez J. R., Waldo M. G., Cabrera G. and B. W. Steider. (1982). Evidence of the Existence of a Factor that Induces Fc Receptors on Bone Marrow Cells. *Blood.* 59:756-760.
- 126) Fragoso A., Arciga M., Calcagno M. and B. W. Steider. (1985). Determination of the Inducers of Fc (FcRI) and C3 (C3RI) Receptors on Myeloid Cells in Several Media from Human and Mouse Origin, and the Identification of the Macrophage as the Cell that Produces these Factors. *Exp. Hematol.* 13:163-168.
- 127) Kurlander R. J. and J. E. Gartrell. (1983). The Binding and Processing of Monoclonal Human IgG1 by Cells of a Human Macrophage-Like Cell Line (U-937). *Blood.* 62:652-662.
- 128) Ravetch J. V. and C. L. Anderson. (1990). Fc $\gamma$ R Family: Proteins, Transcripts and Genes in Fc Receptors and the Action of the Antibodies. *In* Metger H. (ed). *Am. Soc. Microbiol. USA.* p. 211-235.
- 129) Rhodes J., Jones D. H. and N. M. Bleehen. (1983). Increased Expression of Human Monocyte HLA DR Antigens and Fc $\gamma$  Receptors in Response to Human Interferon *In Vivo*. *Clin. Exp. Immunol.* 53:739-743.
- 130) Karibayashi K. and T. Masuda. (1978). Immunological Properties of Fc Receptor on Lymphocytes. *Cell. Immunol.* 35:279-288.
- 131) Guyre P. M., Grazziano R. F., Vance B. A., Morganeli P. M. and M. W. Fanger. (1989). Monoclonal Antibodies that Bind to Distinct Epitopes on Fc $\gamma$ RI are Able to Trigger Receptor Function. *J. Immunol.* 143:1650-1655.
- 132) Shen L., Guyre P. M., Anderson C. L. and M. W. Fanger. (1986). Heteroantibody Mediated Cytotoxicity: Ab to the High Affinity Fc Receptor for IgG Mediates Cytotoxicity by Human Monocytes that is Enhanced by IFN $\gamma$  and is not Blocked by Human IgG. *J. Immunol.* 137:3378-3382.
- 133) Lewis V. A. Koch T., Plutner H. and I. Mellman. (1986). A Complementary DNA Clone for a Macrophage Lymphocyte Fc Receptor. *Nature.* 324:372-375.
- 134) Munn, H., McBride M. and N. K. V. Cheung. (1991). Role of Low-Affinity Fc Receptors in Antibody-Dependent Tumor Cell Phagocytosis by Human Monocyte Derived Macrophages. *Research* 51:1117-1123.
- 135) Gomez F., Chien P., King M., McDermott P., Levison A. I., Rossman M. D. and A. D. Schreiber. (1989). Monocyte Fc $\gamma$  Receptor Recognition on Cell Bound and Aggregated IgG. *Blood.* 74:1058-1065.
- 136) Van de Winkel J. G. J. and P. J. A. Capel. (1993). Human IgG Fc Receptor Heterogeneity: Molecular Aspects and Clinical Implications. *Immunol. Today.* 14:215-221.

- 137) Huizinga T. W. J., Roos D. and A. E. G. K. Von dem Borne. (1990). Neutrophil Fc $\gamma$  Receptors: A Two-Way Bridge in the Immune System. *Blood*. 75:1211-1214.
- 138) TeVelde A. A., Huijbens R. J. F., DeVries J. E. and C. G. Figdor. (1990). IL-4 Decreases Fc $\gamma$ R Membrane Expression and Fc $\gamma$ R Mediated Cytotoxic Activity of Human Monocytes. *J. Immunol.* 144:3046-3051.
- 139) Parren P. H. I., Warmerdam P. A. M., Bocije L. C. M., Arts J., Westerdal N. A. C., Vlug A., Capel P. A. J., Aarden L. A. and J. G. J. Van de Winkel. (1992). On the Interaction of IgG Subclasses with the Low Affinity Fc $\gamma$ RIIa (CD32) on Human Monocytes, Neutrophils and Platelets. *J. Clin. Invest.* 90:1537-1546.
- 140) Anderson C. L., Ryan D. H., Looney R. J. and P. C. Leary. (1987). Structural Polymorphism of the Human Monocyte 40 Kilodalton Fc Receptor for IgG. *J. Immunol.* 138:2254-2256.
- 141) TeVelde A. A., Malefijt R. W., Huijbens R. J. F., Vries J. E. and C. G. Figdor. (1992). IL-10 Stimulates Monocyte Fc $\gamma$ R Surface Expression and Cytotoxic Activity. *J. Immunol.* 149:4048-4052.
- 142) Reep R., Valerius T. H., Sendler A., Gramatzki M., Iro H., Kalden J. R. and E. Platzer. (1991). Neutrophils Express the High Affinity Receptor for IgG (Fc $\gamma$ RI, CD64) After *In Vivo* Application of Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor. *Blood*. 78:885-889.
- 143) Erbe D. V., Collins J. E., Shen L., Graziano R. F. and M. W. Fanger. (1990). The Effect of Cytokines on the Expression and Function of Fc Receptors on Human Myeloid Cells. *Molecular Immunology*. 27:57-67.
- 144) Petroni K. C., Shen L. and P. M. Guyre. (1988). Modulation of Human Polymorphonuclear Leukocyte IgG Fc Receptors and Fc Receptor-Mediated Functions by IFN $\gamma$  and Glucocorticoids. *J. Immunol.* 140:3467-3472.
- 145) Vogel S. N. and D. L. Rosenstreich. (1982). Defective Fc Receptor Mediated Phagocytosis in C3H/HeJ Macrophages. *J. Immunol.* 123:2842-2850.
- 146) Vogel S. N., Finbloom D. S., English K. E., Rosenstreich D. L. and S. G. Langreth. (1982). Interferon Induced Enhancement of Macrophage Fc Receptor Expression:  $\beta$  Interferon Treatment of C3H/HeJ Macrophages Results in Increased Numbers and Density of Fc Receptors. *J. Immunol.* 130:1210-1214.
- 147) Pfefferkorn L. C. and M. W. Fanger. (1989). Cross-linking of the High Affinity Fc Receptor for Human Immunoglobulin G1 Triggers Transient Activation of NADPH Oxidase Activity. *J. Biol. Chem.* 264:14112-14120.
- 148) Tomiyama Y., Kunicki T., Zipf T., Ford S. and R. H. Aster. (1992). Response of Human Platelets to Activating Monoclonal Antibodies: Importance of Fc $\gamma$ RII (CD32) Phenotype and Level of Expression. *Blood*. 80:2261-2268.

- 149) Warmerdam P. A. M., van de Winkel J. G. J., Blug A., Westerdal N. A. C. and P. J. A. Capel. (1990). Molecular Basis for a Polymorphism of Human Fc $\gamma$  Receptor II (CD32). *J. Exp. Med.* 172:19-30.
- 150) Metzger H. (1991). Fc Receptors and Membrane Immunoglobulin. *Curr. Opin Immunol.* 3:40-46.
- 151) Clark M. R., Clarkson S. B., Ory P. A., Stolman N. and I. M. Goldstein. (1989). Molecular Basis for a Polymorphism Involving Fc Receptor II on Human Monocytes. *J. Immunol.* 143:1731-1734.
- 152) Liesveld J. L., Abboud C. N., Looney R. J., Ryan D. H. and J. K. Brennan. (1988). Expression of IgG Fc Receptors in Myeloid Leukemic Cell Lines. *J. Immunol.* 140:1527-1533.
- 153) Chiu C. P. and F. Lee. (1989). IL-6 is a Differentiation Factor for M1 and WEHI-3B Myeloid Leukemic Cells. *J. Immunol.* 142:1909-1915.
- 154) Joiner K. A., Fuhrman S. A., Miettinen H. M., Kasper L. H. and I. Mellman. (1992). *Toxoplasma gondii*: Fusion Competence of Parasitophorous Vacuoles in Fc Receptor Transfected Fibroblasts. *Science.* 249:641-646.
- 155) Rosenfel S. I., Ryan D. H., Looney R. J., Anderson C. L., Abraham G. N. and J. P. Lody. (1987). Human Fc $\gamma$  Receptors: Stable Interdonor Variation in Quantitative Expression on Platelets Correlates with Functional Responses. *J. Immunol.* 138:2869-2873.
- 156) Rubinstein E., Boucheix C., Urso I. and R. C. Carrol. (1991). Fc Receptor Mediated Interplatelet Activation by a Monoclonal Antibody Against  $\beta$ 2 Microglobulin. *J. Immunol.* 147:3040-3046.
- 157) Lanier L. L., Cwirla S., Yu G., Testi R. and J. H. Phillips. (1989). Membrane Anchoring of a Human IgG Fc Receptor (CD16) Determined by a Single Amino Acid. *Science.* 246:1611-1613.
- 158) Perussia B., Acuto O., Forhorst C., Faust J., Lazarus R., Fanning V. and G. Trinchieri. (1983). Human Natural Killer Cells Analyzed by B73.1. A Monoclonal Antibody Blocking Fc Receptor Functions. *J. Immunol.* 130:2142-2148.
- 159) Azzoni L., Kamoun M., Salcedo T. W., Kanakaraj P. and B. Perussia. (1992). Stimulation of Fc $\gamma$ RIIIA Results in Phospholipase C- $\gamma$ 1 Tyrosine Phosphorylation and p56lck Activation. *J. Exp. Med.* 176:1745-1750.
- 160) Darby C., Chien P., Rossman M. D. and A. D. Scheriber. (1990). Monocyte Macrophage Fc $\gamma$ RIII, Unlike Fc $\gamma$ RIII on Neutrophils, Is Not a Phosphatidyl Inositol-Linked Protein. *Blood.* 75:2396-2400.
- 161) Harrison D., Phillips J. H. and Lanier L. L. (1991). Involvement of a Metalloprotease in Spontaneous and Phorbol Ester-Induced Release of Natural Killer Cells Associated Fc $\gamma$ RIII (CD16-II). *J. Immunol.* 147:3459-3465.

- 162) Ory P. A., Goldstein I. M., Kwok E. E. and S. B. Clarkson. (1989). Characterization of Polymorphic Forms of Fc Receptor III on Human Neutrophils. *J. Clin. Invest.* 83:1676-1681.
- 163) Ory P. A., Clark M. R., Talhouk A. S. and I. M. Goldstein. (1991). Transfected NA1 and NA2 Forms of Human Neutrophil Fc Receptor III Exhibit Antigenic and Structural Heterogeneity. *Blood.* 77:2682-2687.
- 164) Shirsat N. V., Zingde S. M., Advani S. H. and B. P. Gotheskar. (1989). The Receptor for IgG on Human Normal and Chronic Myeloid Leukemic Granulocytes: Functional and Biochemical Characterization. *Cancer Biochem. Biophys.* 10:235-243.
- 165) Ting A. T., Karnitz L. M., Schoon K. A., Abraham R. T. and P. J. Leibson. (1992). Fc $\gamma$  Receptor Activation Induces the Tyrosine Phosphorylation of Both Phospholipase C (PLC)- $\gamma$ 1 and PLC $\gamma$ 2 in Natural Killer Cells. *J. Exp. Med.* 176:1751-1755.
- 166) Fridman W. H. (1993). Regulation of B-Cell Activation and Antigen Presentation by Fc Receptors. *Curr. Op. Immunol.* 5:355-360.
- 167) Morrissey P. J., Bressler L., Charrier K. and A. Alpert. (1988). Response of Resident Murine Peritoneal Macrophages to *In Vivo* Administration of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *J. Immunol.* 140:1910-1915.
- 168) Kaszubowski P. A. and J. S. Goodwin. (1982). Monocyte Produced Prostaglandins Induces Fc $\gamma$  Receptor Expression on Human T Cells. *Cel. Immunol.* 68:343-348.
- 169) Loughlin A. J., Woodroffe M. N. and M. L. Cuzner. (1992). Regulation of Fc receptor and Major Histocompatibility Complex Antigen Expression on Isolated Rat Microglia by Tumor Necrosis Factor, Interleukin-1 and Lipopolysaccharide: Effects on Interferon Gamma Induced Activation. *Immunol.* 75:170-175.
- 170) Huppi C., Mock B. A., Hilgers J., Kochan J. and J. P. Kinet. (1988). Receptor for Fc $\epsilon$  and Fc $\gamma$  are Linked on Mouse Chromosome 1. *J. Immunol.* 141:2807-2810.
- 171) Santiago E., Mendoza J. F., Corona T. M., López R., Sánchez L., Mora L., Flores F., Valencia E. and B. W. Steider. (1993). Induction of Fc Receptors on Murine Macrophages and Leukemic Cells by Interleukin-1  $\beta$ . *Eur. Cytokine Netw.* 4:223-228.
- 172) Patridge L. J., Woof J. M., Jefferis R. and Burton D. R. (1986). The Use of Anti-IgG Monoclonal Antibodies in Mapping the Monocyte Receptor Site on IgG. *Mol. Immunol.* 23:1365-1372.
- 173) Naziruddin B., Duffy B. F., Tucker J. and T. Mohanakumar. (1992). Evidence for Cross-regulation of Fc $\gamma$ RIIB (CD16) Receptor-Mediated Signaling by Fc $\gamma$ RII (CD32) Expressed on Polymorphonuclear Neutrophils. *J. Immunol.* 149:3702-3709.
- 174) Ball E. D., McDermott J., Griffin J. D., Davey F. R., Davis R. and C. A. Bloomfield. (1989). Expression of the Three Myeloid Cell-Associated Immunoglobulin G Fc Receptors Defined by

Murine Monoclonal Antibodies on Normal Bone Marrow and Acute Leukemia Cells. *Blood*. 73:1951-1956.

175) Ilfeld D., Barzilay J., Dax Z. and M. Ran. (1986). Correlation of Fc $\gamma$  Receptors on Peripheral Blood Mononuclear Cells and Survival in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Canc. Res. Treat.* 7:181-186.

176) Fanger M. W., Shen L., Grazziano R. F. and P. M. Guyre. (1989). Cytotoxicity Mediated by Human Fc Receptors for IgG. *J. Immunol.* 10:92-101..

**Apéndice 1**  
**Solución Amortiguadora de Fosfatos**  
**(PBS)**

En 1 l de agua bidestilada, se disuelven las siguientes sustancias:

COMPUESTO	CONCENTRACION (g/l)
Cloruro de Sodio	8.00
Fosfato de Sodio Monobásico	2.16
Fosfato de Potasio	0.20
Cloruro de Potasio	0.20

Una vez disueltas las sales se ajusta el pH a 7.2 con Acido Clorhídrico y se esteriliza la solución por medio de autoclave por 20 minutos a 20 lb de presión. Esta solución se emplea para mantener las células durante periodos breves de tiempo así como para los lavados de la cavidad peritoneal de ratón

**Apéndice 2**  
**PREPARACION DEL MEDIO DE**  
**CULTIVO RPMI-1640**

Se mide un 90% del volumen final requerido de agua destilada y desionizada y se coloca en un recipiente de tamaño lo más cercano posible a la medida del volumen final a preparar. La temperatura del agua debe ser de 15-20 °C. Bajo agitación lenta y constante se adiciona el RPMI-1640 (RPMI-1640 MEDIUM, Sigma Chem. U.S.A.) hasta su disolución, no debe aplicarse calor al agua. Con un volumen menor al 5% del total de agua se enjuaga el paquete que contenga el Medio en polvo para remover cualquier traza de este que hubiera quedado adherido y se adiciona al recipiente.

A la solución obtenida se le adicionan 2.0 g de Bicarbonato de Sodio o 26.7 ml de solución de Bicarbonato de Sodio al 75% por cada litro de volumen final de Medio a prepararse. El medio en su presentación comercial contiene ya el aminoácido L-glutamina, sin embargo, el cultivo de células requiere de una mayor concentración del mismo. Por tal motivo, en esta etapa de la preparación se adiciona L-glutamina (Sigma, Chem. U.S.A.) en una concentración 2mM. La agitación es útil para la total disolución de estos compuestos.

Se ajusta la solución a pH 7.2-7.4 a 20 °C usando para este fin Hidróxido de Sodio. Se adiciona la cantidad de agua requerida para completar el volumen final y se esteriliza la solución filtrándola con membranas de poro de 0.22  $\mu$ m.



## COMPOSICION DEL RPMI-1640

Sales Inorgánicas	Concentración (g/l)
Nitrato de Calcio 4H <sub>2</sub> O	0.100
Sulfato de Magnesio anhidro	0.04884
Cloruro de Sodio	6.0
Fosfato Dibásico de Sodio anhidro	0.8
 Aminoácidos	
L-arginina	0.2
L-asparagina	0.050
L-ácido aspártico	0.20
L-cistina 2HCl	0.0652
L-ácido glutámico	0.02
L-glutamina	0.300
Glicina	0.10
L-histidina	0.015
L-hidroxiprolina	0.020
L-isoleucinas	0.050
L-leucina	0.050
L-lisina HCl	0.040
L-metionina	0.015
L-fenilalanina	0.015
L-prolina	0.020
L-serina	0.030
L-treonina	0.020
L-triptofano	0.005
L-tirosina	0.02883
L-valina	0.020
 Vitaminas	
D-biotina	0.0002
Cloruro de Colina	0.003
Acido Fólico	0.001
Myo-Inositol	0.035
Niacinamida	0.001
Acido-p-Amino Benzoico	0.001
Acido-D-Pantoténico	0.00025
Piridoxina HCl	0.001
Riboflavina	0.0002

Tiamina HCl	0.001
Vitamina B-12	0.000005
Otros	
D-Glucosa	2.00
Glutation reducido	0.001
HEPES	5.958
Rojo Fenol	0.0053

### Apéndice 3 Solución de Alsever

En un litro de agua destilada se disuelven los siguientes reactivos:

Dextrosa	20.50 g
Citrato de Sodio Dihidratado	8.00 g
Ácido Cltrico Monohidratado	0.55 g
Cloruro de Sodio	4.20 g

Los reactivos se disuelven con agitación, el pH se ajusta a 6.1 y se esteriliza la solución en autoclave guardándose hasta su uso.

Esta solución se usa para mantener los eritrocitos de camero en condiciones estables por 5 semanas a una temperatura de 4°C. La fórmula descrita es una modificación de la fórmula original de Alsever.

### Apéndice 4 Solución de Tripsina en PBS

En 100 ml de PBS se disuelven 0.006 g de Tripsina tipo II porcina (Sigma Chem., USA) con agitación constante. Una vez disuelta la tripsina, la solución se esteriliza mediante filtración con ayuda de membrana millipore de 22 m. Para evitar su autodigestión, ya que las soluciones pierden el 75% de su actividad a las 3 hrs, la enzima se prepara en el momento de uso. Sólo se pueden preparar soluciones un poco mas estables si en el solvente se añade gelatina parcialmente hidrolizada.

En el organismo la Tripsina se forma por la acción de la enterocinasa sobre el producto pancreático conocido como Tripsinógeno. La enzima una vez madura pesa 24 kD hidroliza los enlaces peptídicos donde participan lisina y/o arginina aunque también es capaz de hidrolizar ésteres y amidas. Su pHi óptimo se encuentra entre 7 y 9.

Fuente: Index Merck (1983). 10a. The Merck Co. USA. pag. 1398.

**Apéndice 5**  
**SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS PARA INMUNOFLUORESCENCIA**  
**PBSI**

En 1 l de agua bidestilada, se disuelven las siguientes sustancias:

COMPUESTO	CONCENTRACION (g/l)
Cloruro de Sodio	8.50
Fosfato de Sodio Monobásico	8.00
Fosfato de Sodio Dibásico	42.00

Una vez disueltas las sustancias, se ajusta el pH a 7.35 con Acido Clorhídrico e Hidróxido de Sodio y se esteriliza la solución por medio de autoclave por 20 minutos a 20 lb de presión. Esta solución se emplea para los lavados de las células durante el desarrollo de la técnica de Inmunofluorescencia.