

00381

25  
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INDUCCION A LA EXPRESION DE RECEPTORES Fc  
POR LA INTERLEUCINA-1 EN CELULAS MIELOIDES  
NORMALES Y LEUCEMICAS DE RATON  
Y HUMANO.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
**D O C T O R**  
**P R E S E N T A :**  
**EDELMIRO / SANTIAGO OSORIO**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. BENNY WEISS STEIDER.**

**MEXICO, D. F.**

**1996**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**TITULO DE TESIS DOCTORAL**

**INDUCCION A LA EXPRESION DE RECEPTORES Fc POR LA INTERLEUCINA-1  
EN CELULAS MIELOIDES NORMALES Y LEUCEMICAS DE RATON Y HUMANO.**

**TESISTA.**

**EDELMIRO SANTIAGO OSORIO**

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, FES-Zaragoza, UNAM.

**COMITE TUTORIAL.**

**DR. JOSE SULLIVAN LOPEZ**

**DR. SERGIO ESTRADA PARRA.**

**DR. BENNY WEISS STEIDER (DIRECTOR DE TESIS).**

## **RECONOCIMIENTOS.**

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, bajo la tutoría del Dr. Benny Weiss Steider y co-tutoría del Dr. Sergio Estrada Parra y Dr. José Sullivan López.

También se agradecen los comentarios y sugerencias de los miembros del jurado: Dra. Alejandra Mainero, Dr. Rubén Darío Martínez, Dr. Mario Gutiérrez y Dr. Hector Mayani.

Este trabajo se desarrolló gracias al apoyo económico del CONACyT (Proyecto Ref D111-903658), de EL PADEP, UNAM (Clave del Proyecto: DFC9017 y DFC9138), DGAPA y de la FES-Zaragoza.

A los compañeros de la Unidad por sus comentarios y sugerencias.

## **DEDICATORIA.**

A María de Jesús, mi esposa, por su amor y apoyo que sumado a mi profesión constituyen mi vida.

A Yazmin, mi hija, una luz que ha llegado a iluminar y completar nuestra vida.

A mi madre que a pesar de haber caminado sin protección en los pies, carecer de un buen cobijo y casi nada para comer, le quedó tiempo y ánimo para enviar a sus hijos a estudiar.

A la memoria de mi padre que nos enseñó la virtud del trabajo.

A mi hermana Balbina y su esposo Ubaldo, a Bertha y su esposo Guillermo porque nutrieron mi formación.

A mi hermano Guillermo y su esposa Teresa por el apoyo que me brindaron.

A mis hermanos Virginia, Donaldo, Armando y Edgar por su apoyo incondicional.

A mis sobrinos

A los familiares

A todos los amigos y compañeros de trabajo.

A los alumnos.

Al Dr. Benny Weiss Steider, en forma muy especial, por las enseñanzas y por la oportunidad brindada para colaborar con su grupo de trabajo

## **INDICE.**

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>2</b>
<b>__HEMATOPOYESIS</b>	<b>3</b>
__Células Hematopoyéticas	3
__Microambiente Hematopoyético	7
__Factores de Crecimiento Hematopoyético	9
<b>__INTERLEUCINA-1 (IL-1)</b>	<b>17</b>
__Familia de la IL-1	17
__Efectos Biológicos de la IL-1	26
<b>__RECEPTORES Fc (FcyR)</b>	<b>32</b>
__Características de los FcyR	32
__Función de los FcyR	44
<b>ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION</b>	<b>48</b>
<b>METODOLOGIA.</b>	<b>51</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>58</b>
<b>DISCUSION Y CONCLUSIONES</b>	<b>84</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>94</b>
<b>SIGLAS DE USO MAS FRECUENTE EN LA TESIS</b>	<b>108</b>

## **RESUMEN.**

En el presente trabajo se evalúa la capacidad de la interleucina-1 beta recombinante humana (rhIL-1 $\beta$ ) para inducir la expresión de receptores para la fracción cristalizante de la IgG (Fc $\gamma$ R) pero no la producción de lisozima en células mieloides normales y leucémicas de ratón y humano. La IL-1 es capaz de inducir una expresión de los Fc $\gamma$ R en células de tipo monocito-macrófagos, pero no en granulocito-neutrófilos, ni en linfocitos, ni de ratones ni de humanos. La IL-1 también tiene un fuerte papel inductor de Fc $\gamma$ R en las líneas leucémicas promielocítica WEHI3Bd- y macrofágica WR19M.1 de ratón, y en la línea leucémica monocítica humana U-937. Estos datos sugieren que la IL-1 activa a los linfocitos para producir una respuesta inmune y activa a los monocito-macrófagos para que expresen Fc $\gamma$ R, lo cual ayuda en la eliminación de los complejos inmunes. Por otro lado, el hecho de que la IL-1 induzca la expresión de los Fc $\gamma$ R en células leucémicas, abre la posibilidad de estudiar el potencial diferenciador de estas citocinas en células de pacientes leucémicos.

## **ABSTRACT.**

Recombinant human interleukin-1 $\beta$  (rhIL-1 $\beta$ ) is shown to be a inducer of Fc receptors (FcR) on murine macrophages and not on granulocytes. Data is provided indicating that rhIL-1 $\beta$  does induce specific but not nonspecific phagocytosis. Macrophages are shown to autoinduce their FcR expression as a function of time in culture. This induction is increased by the use of exogenous rhIL-1 $\beta$  and inhibited by anti- rhIL-1 $\beta$  antibody, pointing to an autocrine regulation of FcR expression on macrophage. On the other hand the myelomonocytic cell line WEHI3BD- and the macrophage like cell line WR19M.1 are also shown to be inducible for the expression of FcR by this molecule. Data is also provide showing that recombinant murine interferon gamma (rmIFN $\gamma$ ) induces FcR on both macrophages and granulocytes. Whereas polyclonal antibodies inhibit FcR induction by IL-1 on macrophage, it does not inhibit FcR induction by IFN $\gamma$  on these cells. This points to a different mechanism of induction of FcR by IFN and IL-1. Finally, the possible application of rhIL-1 $\beta$  *in vivo* to help the organism fight infection is discussed.



## INTRODUCCIÓN

Las moléculas de membrana plasmática que fijan la porción cristalizable (Fc) de la inmunoglobulina G, son conocidas como receptores Fcγ (FcγR). Los FcγR constituyen una familia de tres miembros; FcγRI, FcγRII y FcγRIII y son los responsables de enlazar a los complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ab) con los mecanismos efectores celulares; por ejemplo, permiten la interacción del complejo inmune Ag-Ab con las células como neutrófilos o los macrófagos, los cuales finalmente eliminan blancos celulares cubiertos con anticuerpos, ya sea por fagocitosis o por el mecanismo conocido como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (Segal, 1990). La interacción complejo Ag-Ab con las células efectoras via FcγR favorece la producción de citocinas, generación de radicales libres, e incluso inhiben la producción de anticuerpos (Ravetch, 1994). Estas actividades hacen pensar que los FcγR juegan un papel importante en la modulación de la respuesta inmune y la resistencia a las infecciones.

Los FcγR son expresados principalmente en células maduras como los granulocito-neutrófilos, monocito-macrófagos y linfocitos T y B (Unkeless, et al 1988). Aunque es bien conocido el grupo de citocinas que regulan la generación de este grupo de células maduras a partir de sus precursores en médula ósea, la información de aquellas que regulan la expresión de los FcγR es muy escasa, a pesar de que se ha reportado que son las primeras moléculas en expresarse después de iniciada la diferenciación celular, concretamente se presentan en líneas leucémicas de tipo mielóide y en células precursoras de granulocito-neutrófilos, e incluso la expresión de estos receptores y la producción de lisozima ha sido usada ampliamente como una indicadora temprana de la diferenciación celular en células de ratón y humano (Ruhl and Pluznik, 1993, Kerst, et al 1993). Hasta el momento sólo el IFNγ, IL-6 y el G-CSF, son las citocinas reconocidas como inductoras de receptores; sin embargo algunos datos, incluyendo los de nuestro laboratorio, hacen pensar que la Interleucina-1 (IL-1) también puede estar involucrada (Onozaki, et al 1987, 1988), aunque algunos investigadores encuentran que tiene una acción inhibidora (Arend, et al 1987). Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo principal el evaluar el efecto inductor de la IL-1 en la expresión de FcγR, producción de lisozima y el tipo de población celular estimulada.

## **HEMATOPOYESIS.**

Las células de la sangre tienen 2 principales funciones, los eritrocitos se encargan del transporte de O<sub>2</sub>, mientras que los leucocitos se encargan de la defensa del organismo contra la invasión de agentes patógenos, ya sean exógenos (bacterias, hongos, etc.) o endógenos (virus, células tumorales y células normales senescentes). Muchas de ellas mueren en esta tarea, por ende, en el humano se requiere de una producción de aproximadamente 370, 000 millones de células sanguíneas por hora (Allen and Dexter, 1990), para mantener constante el número de células sanguíneas circulantes. Esta producción, en el organismo adulto, se da en la médula ósea mediante un proceso conocido como hematopoyesis, en el cual las células hematopoyéticas (células progenitoras o seminales hematopoyéticas, células progenitoras en diferente grado de maduración y células maduras), se multiplican y se diferencian hacia los diversos linajes celulares sustentado primordialmente por un nicho o microambiente hematopoyético en la médula ósea. El microambiente hematopoyético lo constituyen células estromales como fibroblastos, endoteliales, adipocitos, macrófagos, etc., células que pueden originarse a partir de los precursores hematopoyéticos (Huang and Terstappen, 1992). Las células estromales producen una serie de moléculas conocidas como citocinas o factores de crecimiento hematopoyético (HGF, por sus siglas en Inglés; hematopoietic growth factors), y son las responsables de modular la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas hasta generar 8 diferentes tipos de células sanguíneas maduras: las que proviene de un linaje mielóide (eritrocitos, megacariocitos, monocito-macrófagos, granulocito-neutrófilo, basófilo-célula cebada y eosinófilo) y un linaje linfóide (linfocitos T y B).

### **Células hematopoyéticas.**

La existencia de las células progenitoras hematopoyéticas fue revelada a principios de los años 60 por Till y McCulloch, cuando descubrieron que se evitaba la muerte de ratones irradiados letalmente mediante la inyección de células de médula ósea normal (Till and McCulloch, 1980). Focos de alta tasa de proliferación celular se localizaban en el bazo de los ratones recuperados, cada foco de crecimiento contenía células en diferente grado de maduración, estos eran de tipo granulocítico, monocítico o eritrocítico, y lo más interesante es que también se formaban focos de proliferación constituida por una mezcla de estos tipos celulares incluyendo a los linfocitos. Cada foco de células en crecimiento proviene de la multiplicación de una sola célula precursora, la proliferación de varias de ellas son las responsables de reconstituir el tejido hematopoyético de los ratones transplantados (Gordon, et al 1985). A las células capaces de dar origen a un nódulo de proliferación,

después de 7 a 14 días del trasplante, se les llamó unidad formadora de colonias del bazo (CFU-S del Inglés Colony Forming Unit-Spleen). Los cultivos *in vitro* de células de médula ósea de ratón por 7 días también desarrollaron colonias de células hematopoyéticas, lo que confirmó la existencia de la CFU-S (Metcalf and Moore, 1971). Fue así como se concluyó que en la médula ósea existen células progenitoras hematopoyéticas con la capacidad de reconstituir la hematopoyesis en individuos inmunodeficientes.

Los focos de proliferación compuestos de células de tipo granulocito, monocito, etc. y la formación de focos de proliferación con composición celular mixta, indica la existencia de células precursoras monopotenciales y multi o pluripotenciales. Las CFU-S multipotenciales fueron consideradas como las células precursoras hematopoyéticas más primitivas a las cuales se les llamó célula tallo hematopoyética pluripotencial (PHSC), y se le definió como células con capacidad de autorenovación, alto potencial proliferativo y capacidad para diferenciarse a todos los linajes hematopoyéticos (Orlic and Bodine, 1994), pero que morfológicamente son indistinguibles de otras células precursoras en diferente grado de maduración. Esta definición aun es vigente, sin embargo se ha establecido que las células CFU-S no son las más primitivas, ya que la mayoría de estas células desaparecen después que los ratones han sido tratados con 5-Fluorouracilo, en su lugar aparece otro grupo de células que forman colonias a más largo plazo (de 12 hasta 16 días); conocidas como células formadoras de colonias de alto potencial proliferativo (HPP-CFC), y con la capacidad de dar origen a células monopotenciales y clones multipotenciales con alto potencial proliferativo (revisado en Niskamen, 1992). En humanos también se ha identificado un grupo de células que semejan a las HPP-CFC en ratón, a las cuales se les ha denominado células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC) (Sutherland, et al 1990, Szilvassy, et al 1989). Estas características parecen ajustarse más a la definición de una célula PHSC, sin embargo, hasta el momento ha sido difícil identificar claramente a este grupo de células (Berardi, et al 1995). Algunos investigadores han intentado purificar y separar a homogeneidad a las células PHSC de los CFU-S por flujo citométrico y uso de anticuerpos monoclonales contra antígenos de superficie como Sca-1<sup>+</sup> y H-2k<sup>h</sup>, c-kit<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup> en ratones y CD34<sup>+</sup>, Thy-1<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup> en células humanas (Orlic and Bodine, 1994, Berardi, et al 1995, Morrison, et al 1995). Estos marcadores permite enriquecer la población de células seminales, pero ninguno de estos marcadores puede distinguir por completo una población de otra, esto se debe principalmente a que las células precursoras desde las más primitivas hasta las más comprometidas se encuentran mezcladas y forman un continuo celular en los que sus diferentes inmunofenotipos se traslapan. Lo innegable es que las células primitivas hematopoyéticas altamente purificadas provenientes del saco vitelino e hígado fetal o de médula ósea adulto, tienen el potencial de repoblar médula ósea de ratones irradiados hasta

en 7, 6 y 3 pasajes respectivamente (Lansdorp, 1995), estos datos reafirman la existencia de las PHSC, considerando que son las únicas células con el potencial de repoblación. Llama la atención que las células primitivas de médula ósea de ratón adulto tengan menor potencial de repoblación, esto implica probablemente que a lo largo de su ontogenia sufren modificaciones en su potencial de proliferación de tal manera que en el ratón adulto se encuentra disminuido considerablemente.

Es pertinente señalar que las células precursoras también se encuentran en circulación sanguínea y su número se incrementa al suministrar factores de crecimiento hematopoyético como el GM-CSF (factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos), e IL-1 (Interleucina-1) (Williams and Morrissey, 1989, Gasparetto, et al 1990). Esta técnica está siendo usada ampliamente para colectar células precursoras del torrente sanguíneo para el trasplante de médula ósea.

Por las características de las PHSC, se considera que dan origen a las CFU-S (ambos constituyen el compartimiento de células tallo). Las CFU-s dan origen a células precursoras comprometidas de linaje oligo o monopotentes, incluyendo aquellos precursores reconocidos por su morfología (células progenitoras comprometidas), las cuales finalmente dan origen a uno de los 8 linajes de células maduras (Figura 1). Cada célula precursora de linaje comprometida generalmente se le denomina como Unidad o Célula Formadora de Colonias (CFU o CFC). Dentro del linaje mieloide se reconoce a las unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E), las células formadoras de colonias de eosinófilos (Eos-CFC), de basófilos o células cebadas (Mast-CFC), de megacariocitos (Meg-CFC) y la única célula considerada bipotencial que da origen a macrófagos y granulocitos (GM-CSC) (Lowry and Quesenberry, 1992), aunque es pertinente señalar que recientemente se publicó un trabajo en el que se dan evidencias de que la célula bipotencial no existe (Mora, et al 1992). En relación al linaje linfóide se considera que las células pre-T y pre-B derivan directamente de las PHSC (Figura 1), aunque algunos investigadores consideran que pueden provenir de las CFU-S (Dexter, 1989, Berardi, et al 1995)

El producto de la proliferación y diferenciación de las células precursoras de linaje comprometidas constituyen el compartimiento de las células maduras hematopoyéticas, normalmente localizadas en la sangre y otros tejidos. Estas células son funcionalmente maduras y son las responsables del transporte de oxígeno (eritrocitos), producción de plaquetas tan importantes en la coagulación sanguínea (megacariocitos) y de la inmunidad natural o específica en la eliminación de los agentes patógenos; los macrófagos, neutrófilos, basófilos y eosinófilos son los principales constituyentes de la inmunidad natural, mientras que los linfocitos T y B son responsables de la inmunidad específica.

## ESQUEMA DE LA HEMATOPOYESIS

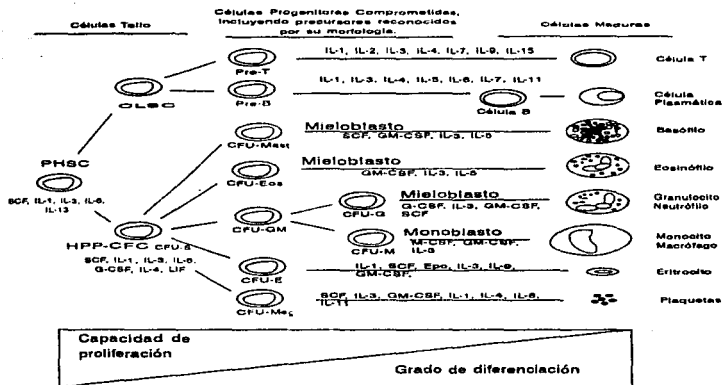


Figura 1. Modelo Jerárquico de la hematopoyesis en el que se señalan las diferentes células y factores que intervienen (Tomado y modificado de Lowry and Quisenberry, 1982).

PHSC, Célula tallo hematopoyética pluripotencial.  
 CLSC, Célula tallo de células linfoides.  
 HPP-CFC, Célula formadora de colonias de alto potencial proliferativo.  
 CFU.S, Unidad formadora de colonias del bazo.  
 SCF, Factor de células tallo.

GM-CSF, Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.  
 M-CSF, CSF de macrófagos.  
 G-CSF, CSF de granulocitos.  
 Epo, Eritropoyetina.  
 IL, Interleucina (de la 1 a la 15)

Es importante señalar que la capacidad de proliferación es muy acentuada en el compartimiento de las células tallo, prácticamente se reduce a la mitad en el compartimiento de las células progenitoras comprometidas y es extremadamente reducida o nula en el compartimiento de las células maduras, mientras que el grado de diferenciación y maduración en estas células es exactamente lo inverso (Figura 1) (Dexter, 1989).

Existen dos hipótesis para explicar como ocurre la autorrenovación o comprometimiento (diferenciación) de una célula tallo. El modelo determinístico establece que no cualquier célula seminal sufre un comprometimiento, ya que éstas son influenciadas por factores intrínsecos como la expresión de ciertos marcadores celulares y por el efecto de factores microambientales (los HGF) que las comprometen irreversiblemente a un linaje celular, sin olvidar que también influye en forma preponderante el microambiente que rodea a la célula (D'Andrea, 1994, Morrison et al, 1995). El modelo estocástico establece que cualquier célula seminal tiene la misma probabilidad de sufrir autorenovación, o entrar al compartimiento de comprometimiento. Las citocinas sólo facilitan la progresión de estos eventos (Ogawa, 1993).

#### **Microambiente hematopoyético.**

En los adultos, las células precursoras hematopoyéticas, se localizan en el estroma de la médula ósea, dentro del tejido esponjoso de los huesos. El estroma de la médula ósea esta constituido por células reticulares endoteliales, fibroblastos, adipocitos y macrófagos. Se considera que este grupo de células y la matriz extracelular constituyen el nicho indispensable para la sobrevivencia, autorreplicación, y compromiso de las células PHSC hacia los diferentes linajes celulares hematopoyéticos (Figura 2) (Allen and Dexter, 1990). El desarrollo de la técnica de cultivo *in vitro* de tejido hematopoyético a largo plazo (cultivos Dexter), ha permitido establecer que la hematopoyesis se sostiene gracias a que las células integrantes del estroma producen HGF o citocinas hematopoyéticas. Las citocinas detectadas en los cultivos Dexter son: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF, M-CSF, G-CSF, SCF, IL-2, IL-7, IL-13, IL-10, TNF, TGF (Testa, et al 1993), y se sugiere que también IL-3 es producida por las células estromales (Lowry and Quesenberry, 1992), incluso hasta antagonistas de algunas citocinas como el IL-1Ra (Aman, et al 1994), lo que puntualiza la importancia de las células estromales de la médula ósea para soportar una hematopoyesis continua.

Las citocinas secretadas pueden permanecer en forma soluble o unidas a moléculas de la matriz extracelular. El ejemplo de un fijador de HGF en la matriz extracelular es sulfato de heparina, ya que tiene la capacidad de fijar IL-3 y GM-CSF (Allen and Dexter, 1990).

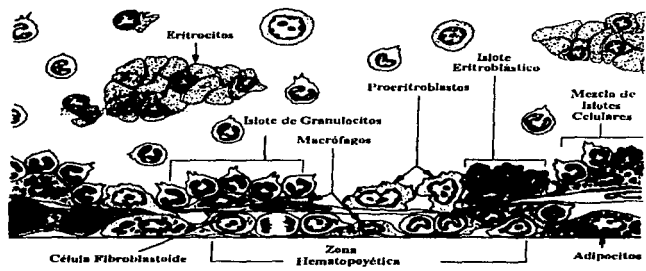


Figura 2. Diagrama que muestra los tipos celulares constituyentes del estroma y su interacción con las células hematopoyéticas (tomado de Allen and Dexter, 1990).

También se han encontrado citocinas adheridas a la membrana celular como es el caso de la SCF, IL-1 y del M-CSF (Lowry and Quesenberry, 1992).

Se ha observado que las células estromales pueden ser afectadas por la presencia de factores externos, así se ha establecido que la adición de IL-3 o GM-CSF exógeno favorece la formación de células maduras de linaje monocito-granulocito y aumenta el número de precursores GM-CFC (Coutinho, et al 1990), pero también se favorece el aumento del número de células endoteliales, y una reducción de la adipogénesis (Schrro, et al 1989). Por otro lado, varios agentes quimioterapéuticos producen daños al estroma de la médula ósea, el cual puede prevalecer por varios años, e incluso es irreversible. En cultivos a largo plazo con células de médula ósea de pacientes con linfomas, tratados con mustina, vimblastina, procarbina y prednisolona después de 9 años, desarrollaron una monocapa de células estromales que sólo cubrió como máximo un 60 % de la caja de cultivo, mientras que las células de médula ósea de pacientes no tratados, cubrieron el 100 % del substrato de cultivo (Radford, et al 1990). Los estudios realizados en ratón indican que el daño al estroma es permanente (Testa, et al 1988).

El soporte de la hematopoyesis por las células estromales de pacientes tratados con quimioterapia en presencia de citocinas, aunque muestran un incremento relativo similar al mostrado por los cultivos de células estromales normales, el número celular absoluto generado fue menor (Coutinho, et al 1990), esto indica que el estroma reduce su potencial para soportar la hematopoyesis, probablemente porque existe un menor número de células estromales nodrizas para las células seminales hematopoyéticas. Por otro lado, también se tienen reportes que la pancitopenia, en algunos casos con pacientes con anemia aplásica, se correlaciona con el daño a las células estromales (Knospe, et al 1994). Los hematólogos clínicos están aplicando dosis altas de quimioterápicos para eliminar las células neoplásicas, lo que implica un mayor riesgo de daño para las células estromales y por tanto al ambiente hematopoyético e inclusive puede ser irreversible. Sería conveniente encontrar alternativas de tratamiento para proteger a las células estromales y células hematopoyéticas, antes de someter al paciente a un régimen de quimioterapia y así disminuir las lesiones a largo plazo.

#### **Factores de crecimiento hematopoyético.**

Las células estromales de la médula ósea tienen una participación fundamental para sustentar la hematopoyesis y destaca su capacidad para producir los factores de crecimiento hematopoyético. Se llegó a esta conclusión porque el cultivo *in vitro* de células precursoras hematopoyéticas provenientes de la médula ósea de ratón, sólo proliferaron en presencia de células estromales, o del medios de cultivo condicionado (exudado) por células integrantes del estroma de la médula ósea (Pluznik and Sachs, 1965, Bradley and Metcalf, 1966). Más



tarde se demostró que la proliferación de las células precursoras hematopoyéticas era responsabilidad de los factores glicoproteicos presentes en el exudado. Los factores obtenidos de los diferentes tipos celulares, mostraban mayor actividad sobre un linaje celular específico; el factor proveniente de medio condicionado de fibroblastos induce la formación de colonias de monocito-macrófago. El de macrófago induce la formación de colonias de granulocitos, y el de epitelio induce la formación de colonias de granulocito-macrófago (Metcalf and Burgess, 1982). Por sus propiedades, este grupo de moléculas recibieron el nombre de factores estimuladores de colonias (CSF's). Para la denominación de cada CSF se antepuso la letra inicial del grupo de células precursoras que tienen como blanco principal, el factor que da origen a los macrófagos se le conoce como M-CSF, al de granulocitos G-CSF y al de granulocito-macrófagos GM-CSF (Metcalf and Burgess, 1982). La identificación del factor que induce la proliferación de varios linajes celulares incluyendo eosinófilos, eritrocitos, basófilos, megariocitos, granulocito-neutrófilos, y monocito-macrófagos se le denominó Multi-CSF, también conocido como interleucina-3 (IL-3) (Metcalf, 1993). Cabe señalar que al GM, G y M-CSF también se le conoció como inductor de macrófagos y granulocitos-1 ( MGI-1) (Sachs, 1987b).

La clonación de células hematopoyéticas sustentada por los CSF's, la identificación y clonación de genes de los CSF's así como de sus receptores y la producción de citocinas recombinantes, ha facilitado la caracterización de estos y otros factores que inducen la proliferación y diferenciación de células precursoras comprometidas e incluso de células tallo pluripotenciales (Figura 1), pero también de aquellos que regulan negativamente la proliferación. Al conjunto de estos factores, incluyendo a los CSF's, se les conoce como factores de crecimiento hematopoyético (HGF), o citocinas hematopoyéticas (Metcalf, 1989, Sieff, 1990), actualmente se conocen más de 30 y la lista puede ir creciendo (Tabla 1) (Yoshida, 1994). En la actualidad existe un grupo de citocinas conocidas como interleucinas que van de la 1 a la 15 (IL-1 a IL-16) también regulan la proliferación de las células mieloides y linfoides (Figura 1, Tabla 1). La eritropoyetina (Epo), como el M-CSF, es un factor linaje específico para la generación de eritrocitos (Dexter, 1989). El factor de células tallo (SCF), es una citocina que favorece la sobrevivencia y proliferación de las células seminales (Zsebo, et al 1990) (Figura 1) y recientemente se ha caracterizado otro factor denominado ligando para el *fl* 3, un receptor tirosina cinasa, el cual muestra una actividad reducida de HGF en células tallo, pero sinergiza la actividad de otras citocinas (Rosnet, et al 1993).

Las citocinas que modulan la actividad de las células hematopoyéticas se han dividido, por su efecto biológico y características moleculares, en varias familias; factores de crecimiento, interleucinas, interferones, factor de necrosis tumoral, factor de crecimiento transformante,

factor inhibidor de leucemias. Un esquema de las familias de las citocinas, sinónimos, localización cromosómica y peso molecular se desarrolla en la Tabla 1.

#### Moduladores negativos de la hematopoyesis.

Las células precursoras hematopoyéticas se caracterizan por encontrarse en constante proliferación para garantizar su autorrenovación, y también el suministro continuo de células maduras. Los factores inductores de la proliferación celular han sido investigados continuamente, pero se conoce poco de las moléculas que la inhiban. Las citocinas reguladoras negativas de la hematopoyesis son el TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y IFN- $\alpha$  (Tabla 1) (Yoshida, 1994). La mezcla de citocinas constituida por IL-3, SCF, G, M, y GM-CSF, IL-1 e IL-6, revierte la actividad inhibitoria ejercida por el TGF- $\beta$  sobre células precursoras de médula ósea de ratón, pero la actividad proliferativa mostrada por la mezcla de esas citocinas fue bloqueada por una combinación de inhibidores (TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) (Jacobsen, et al 1994b). La proteína inflamatoria de macrófagos (MIP) no impidió la proliferación en forma aislada ni en combinación con otros inhibidores (Jacobsen et al 1994b), aunque hay datos que lo señalan como un inhibidor de la hematopoyesis (Mayani, et al 1995). El IFN- $\alpha$  también es un agente que interfiere con la hematopoyesis, esta actividad la ejerce por la producción del antagonista del receptor de la Interleucina-1 (IL-1Ra) en las células estromales, este antagonista evita la actividad biológica de la IL-1, molécula que es indispensable para la producción de GM-CSF y su ausencia se correlaciona con una disminución drástica de la hematopoyesis (Aman, et al 1994); pero no se evaluó el efecto del IFN- $\alpha$  sobre la producción de otros CSF's como M-CSF, SCF o la propia IL-3 por las células estromales. Los resultados de estos estudios podrían complementar la participación de este inhibidor en la hematopoyesis.

Se ha considerado a la IL-6 y al LIF como reguladores negativos de la hematopoyesis (Sachs and Lotem, 1994), sin embargo existen datos que demuestran que más bien interactúan con otros CSF's para promover la hematopoyesis. La IL-1 también ha sido señalada como un agente inhibidor pero sólo para algunas líneas leucémicas (Onozaki, et al 1988), por tanto su papel como inhibidor de la hematopoyesis aun no ha sido completamente esclarecido. La IL-10 es considerada como regulador negativo de la respuesta inmune (Oswald, et al 1992), y un inhibidor de la hematopoyesis, principalmente por su capacidad para suprimir la activación de macrófagos y linfocito T, productoras principales de citocinas después de la aparición de un inmunógeno. Las principales citocinas afectadas en su producción son IL-2, IL-3, TNF $\beta$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF (de Waal Malefyt, et al 1991).

**CITOCINAS QUE MODULAN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE CELULAS  
HEMATOPOYÉTICAS**

Familias	Moléculas	Sinónimos	Cromosoma	Peso Mol. (Kd)	Inhibidores de Proliferación
<b>Factores de Crecimiento</b>	MULTI-CSF	IL-3	5q23	14-28	
	GM-CSF	CSF- $\alpha$	5q23	14-15	
	G-CSF	CSF- $\beta$	17q11	18-22	
	M-CSF	CSF-1	5q33	35 x 2	
	EPO	ligando c-kit	7q11	34-39	
	SCF			51 x 2	
<b>Interleucinas</b>	IL-1	hematopoyetina-1	2q	17.5	x?
	IL-2	TCCGF	4q	15-20	
	IL-3	MULTI-CSF	5q23	14-28	
	IL-4	BSF-1	5q	15-20	
	IL-5	BCCGF-II	5q	21.5 x 2	
	IL-6	BSF-2	7q	21-28	
	IL-7		8q	25	
	IL-8	NCF/NAP	4q	8-10 x 2	
	IL-9	p40	5q	32-39	
	IL-10		1	19 x 2	
	IL-11		19q	20-23	
	IL-12			35-40	
	IL-13		5q	12	
	IL-14				
	IL-15				
IL-16	LCF		56		
<b>Interferones</b>	IFN- $\alpha$	IFN de leucocitos	9q	16-27	
	IFN- $\beta$	IFN de fibroblastos	9q	20	
	IFN- $\gamma$	IFN immune	12q	17 x 2	
<b>Factores de Necrosis Tumoral</b>	TNF- $\alpha$	Cachectina	6p	17 x 1-3	XXXXXXXXXXXXXXXXXX
	TNF- $\beta$	Linfotoxina	6p	20-180 x 3	XXXXXXXXXXXXXXXXXX
<b>Factores Crecim.</b>	TGF- $\alpha$		2	26	
<b>Transformante</b>	TGF- $\beta$		19q o 14q	12.5 x 2	
<b>Fac Inhi Leucocitos</b>	LIF		22q	46	XXXXXXXXXXXXXXXXXX

**Tabla 1. Citocinas Hematopoyéticas (revisado en Bendzen, 1994 y complementado con Laberge, et al 1996).**  
 CSF: Factor Estimulador de Colonias  
 GM- Granulocito-Macrófago  
 M- Macrófago  
 G- Granulocito  
 SCF: Factor de Células Tallo  
 LCF: Factor quimioatráctico para linfocitos  
 TCCGF: Factor de Crecimiento de Células T  
 BSF- Factor Estimulador de Células B  
 NCF- Factor Quimioatráctico de Neutrófilos  
 NAP: Proteína Activadora de Neutrófilos  
 EPO: Eritropoyetina

Por otro lado, recientemente se ha descrito a un polipéptido de 63 000 daltones denominado supresina (SPN), esta molécula muestra una actividad inhibitoria de la proliferación de linfocitos T, células leucémicas y de linfomas, además se encuentran niveles altos de este factor en linfocitos en reposo, probablemente bloqueando la entrada al ciclo celular (LeBocuf, et al 1990). La SPN, induce la producción de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , por lo que los autores la consideran un regulador negativo central (Ban and LeBocuf, 1994).

Estos datos parecen indicar que en el futuro el número de inhibidores de la hematopoyesis puede crecer, mientras tanto es importante mencionar que a diferencia de las CSF's, el TGF- $\beta$  se detecta en grandes cantidades en el tejido hematopoyético (Ellingsworth, et al 1986), por su parte el IFN $\alpha$  y el IFN- $\gamma$ , son producidos por varias células, incluyendo los constituyentes del estroma medular como células endoteliales y macrófagos, entre otras (Aman, et al 1994), por tanto es posible que las 3 moléculas sean las principales inhibidoras de la hematopoyesis. Sin embargo esta conclusión debe manejarse con precaución ya que se ha demostrado que algunos inhibidores también muestran actividad proliferativa, tal es el caso del TNF que en combinación con la IL-3 favorece la hematopoyesis (Cáceres and Hoang, 1992).

#### Receptores de los HGF

Para que los factores de crecimiento hematopoyéticos ejerzan su actividad biológica deben unirse a receptores específicos sobre las células blanco (Nicola, 1989). Las células hematopoyéticas no expresan los mismos tipos de receptores, así se ha observado que las células tallo, pero no las células maduras hematopoyéticas, presentan preferentemente receptores para SCF (Ogawa, et al 1991), a diferencia de los progenitores más maduros que portan receptores para GM-CSF, IL-3, G-CSF y M-CSF entre otros (Ogawa, et al 1991). La formación del complejo ligando-receptor trae como consecuencia el desencadenamiento de señales intracelulares a través de la activación de tirosina cinasas, dando como resultado final la activación celular (Linnekin, et al 1992), ya sea favoreciendo la proliferación o la actividad funcional de las células maduras.

En base a la homología en los dominios relevantes en la traducción de señales de los receptores, estos se han dividido en dos grupos principales. La familia de receptores de tirosina cinasa (RTK) y los receptores de las citocinas (CR) (Figura 3) (Hallek, 1995). Los RTK son moléculas con un dominio extracelular responsable de fijar al ligando, un dominio transmembranaral y un dominio citoplasmático, región con actividad de tirosina cinasa y responsable directo de iniciar las señales intracelulares. Los receptores para el M-CSF y SCF son integrantes de esta familia. La unión del ligando al receptor RTK induce la formación de homodímero y la subsecuente activación del dominio cinasa, transforación de los

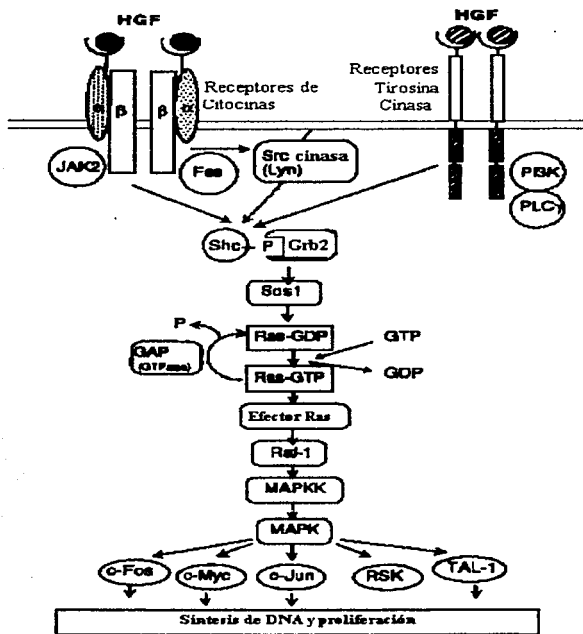


Figura 3. Cascada de la inducción de señales inducidas por los factores de crecimiento hematopoyético unidos al receptor de citocinas o al de tirosina cinasas (tomado de Halleck, 1995).

homodímeros sobre los residuos de tirosina, y finalmente la formación de complejos con distintas proteínas de señalización, las cuales se unen físicamente y con alta afinidad a los RTK fosforiladas (Lev, et al 1991). Estas proteínas son fosfolípasa C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) y fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), y también se menciona la fijación de la proteína activadora de GTPasa *ras* (Cantley, et al 1991). Después de este evento de activación inicial, se promueve la fosforilación de diferentes sustratos que son los mismos involucrados en la ruta de señalización del segundo grupo de receptores; los receptores de citocinas (CR) (Cosman, et al 1990).

La familia de los CR esta constituida por receptores para la IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-11, eritropoyetina (EPO), GM-CSF, G-CSF y LIF (Cosman, et al 1990, Nicola and Metcalf, 1991). Mientras que los receptores de IFN, TNF, y de la IL-1 se consideran independientes de las dos familias de receptores que nos ocupa (Taga and Kishimoto, 1992). La familia de los CR a diferencia de los RTK, constan de una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  es un receptor célula específico, mientras que la  $\beta$ , parece ser compartida entre algunos grupos de receptores de las citocinas, tal es el caso de los receptores de la IL-3, GM-CSF e IL-5 (Hara and Miyajima, 1995); otro ejemplo lo constituyen los receptores de la IL-6, IL-11 y el LIF (Taga and Kishimoto, 1992). Los CR son proteínas con un dominio extracelular responsable de la fijación del ligando, un tallo transmembranaral y un dominio citoplasmático al cual no se le reconoce un sitio evidente de actividad de tirosina cinasa (Bazan, 1990).

A pesar de carecer de un dominio cinasa en los CR, la unión de su ligando induce la fosforilación de tirosina de varias fosoproteínas celulares, muchas de ellas detectadas segundos después del estímulo (Kanakura, et al 1990, Hallek, 1995). Esto sugiere que la activación del receptor induce la asociación de los CRs con al menos una tirosina cinasa.

Se han dado fuertes evidencias de que las proteínas cinasas como JAK2 y productos del proto-oncogen *c-fes/c-fps*, una proteína de 92 kd, se unen directamente a los CR a través de la cadena  $\beta$  (Hanazono, et al 1993, Stahl and Yancopoulos, 1993). Otros estudios indican que miembros de las familias de Src cinasa, concretamente Lck, Fyn y Lyn han sido fosforiladas después de la unión de la IL-2 a su receptor (Torigoe, et al 1992a), Lyn también esta involucrado en la ruta de señalización IL-3, GM-CSF e IL-6 (Torigoe, et al 1992b), aunque se sospecha que se unen directamente a los CR.

La activación de los RTK y CR inducen la fosforilación de proteínas intracelulares, pero el número varía en base al receptor activado, así se ha demostrado que la línea celular megacarioblástica MO7 (la cual expresa receptores para IFN- $\gamma$ , IL-3, IL-4, IL-9, GM-CSF, G-CSF y SCF), después de una estimulación con SCF se fosforilan hasta 16 proteínas intracelulares (Hallek, et al 1992). La IL-3 y GM-CSF induce la fosforilación de 12

proteínas (Kanakura, et al 1990, Hallek, et al 1992), y mucho más restringida es la acción para la EPO con sólo 3 (Komatsu, et al 1992). Estos datos explican porqué algunos factores como SCF modula la proliferación de células tallo a diferencia de la EPO que esta restringida al linaje eritrocítico.

Hallek (Hallek, 1995) propone que después de la activación y unión de PLC y PI3K en la ruta de los RTK y de JAK2, c-fes/c-lps y probablemente Lyn en la via de los CR, ambas familias de receptores usan una ruta de señalización común, particularmente actuando como una reacción en cadena sobre las cinasas: Shc/Grb2, Sos 1, Ras y Raf-1, quien finalmente fosforila a las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), quien a su vez activan a los reguladores transcripcionales como c-Fos, c-Myc y c-Jun, lo que da como resultado la activación celular (Figura 3).

## **INTERLEUCINA-1.**

Hace 55 años se caracterizó una proteína obtenida de los exudados de una inflamación aguda, su peso molecular variaba de 10, 000 a 20,000 daltones, lábil al calor y con la propiedad de producir fiebre después de la inyección en animales y humanos, razón por la cual se le denominó pirógeno endógeno (Dinarelo, et al 1977, Atkins, 1989), factor que también induce la síntesis de proteínas de fase aguda en hepatocitos, disminuye los niveles de zinc y hierro en el plasma, causa neutrofilia, aumenta la respuesta de células T a mitógenos y antígenos *in vitro* (Kampschmidt, 1981). El pirógeno endógeno es producido por leucocitos en respuesta a las infecciones, toxinas microbianas, agentes inflamatorios, productos de leucocitos activados y factores del complemento (Dinarelo 1989a). Debido a que este pirógeno es producido por leucocitos y su blanco son los propios leucocitos, se consideró conveniente denominarlo interleucina-1 (IL-1) que quiere decir "entre leucocitos" (Dinarelo 1989a). Existen dos formas glicosiladas de la IL-1, una forma ácida denominada Interleucina-1 alfa (IL-1 $\alpha$ ) cuyo punto isoeléctrico es de 5 y una forma neutra, la Interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) con pI de 7.2. Ambas moléculas en su forma madura tienen un peso molecular de 17,000 daltones (March et al, 1985). La clonación de los genes y obtención de proteínas recombinantes de esta citocina ha permitido establecer que las moléculas conocidas como pirógeno endógeno (Dinarelo 1986), mediador endógeno leucocitario (Kampschmidt, 1981), factor activador de linfocitos (Gery and Waksman, 1972), factor de células mononucleares (Krane, et al 1985), catabolina (Saklatvala, et al 1985), factor activador de osteoclastos (Dewhirst, et al 1985), hemopoiétina-1 (Mochizuki, et al 1987), son sinónimos de la IL-1.

### **Familia de la interleucina-1.**

La IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  son las formas biológicamente activas, incluso se unen al mismo receptor a pesar de no tener mucha homología, sin embargo, existe otra molécula similar a la IL-1 $\beta$  que se une al mismo receptor, pero a diferencia de las dos primeras, no despierta ninguna actividad biológica, por estas características se le ha dado el nombre de antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1Ra). Las tres moléculas constituyen la familia de la IL-1. Los



genes que codifican para cada miembro de la familia de la IL-1 se localizan en el brazo largo del cromosoma 2, sitio en el que también se localizan los genes para los dos tipos de receptores que fijan a la IL-1 (IL-1RI, IL-1RII) (Webb, et al 1986)

Los primeros genes clonados fueron el de la IL-1 $\alpha$  de ratón (Lomedico, et al 1984) y el de la IL-1 $\beta$  humana (Auron, et al 1984), más tarde se clonó el gen de la IL-1 $\alpha$  humana (Furutani, et al 1986). Actualmente se conocen los genes de la IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  de ratón y humano, ambos contienen 7 exones y 6 intrones. El primer exón codifica para la región no traducida 5', los siguientes tres exones codifican para la región propéptido, mientras que la región madura de la IL-1 es codificada por los tres exones restantes. El último exón también codifica para la región no traducida 3' (Telford, et al 1986, Furutani, 1994). A excepción del IL-1Ra, los otros dos genes carecen de un péptido señal clásico de las proteínas de secreción (Eisenberg, et al 1991) y sólo la IL-1 $\alpha$  no tiene una caja TATA como tal (Shirakawa, et al 1993).

La IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  son moléculas secretadas de 17, 000 daltones, sin embargo la clonación de genes permitió establecer que cada gen sintetiza péptidos de mayor tamaño conocidos como pro-IL-1. Tanto la pro-IL-1 $\alpha$  como la pro-IL-1 $\beta$  tienen un peso molecular de 31,000 daltones y ambas son cortadas por enzimas proteolíticas para generar las formas maduras. Cabe señalar que la forma inmadura y madura de la IL-1 $\alpha$  son biológicamente activas, en cambio la IL-1 $\beta$  sólo es activa en su forma madura (Dinarello, 1994a). Por otro lado, la IL-1 $\alpha$  es la principal forma de IL-1 adherida a membrana y se le responsabiliza de ser la molécula en la cual se unen los linfocitos a los macrófagos para formar rosetas en el timo, sin embargo también se encuentra a la IL-1 $\alpha$  en circulación. En lo que respecta a la IL-1 $\beta$ , es una molécula preferentemente de secreción (Dinarello, 1994b). Cabe señalar que se han encontrado péptidos inmunoreactivos y biológicamente activos de IL-1 con pesos moleculares de 2, 4, 6, 10, 11 y 22 mil daltones (Dinarello, 1989a). La IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  pueden encontrarse en el sobrenadante de los cultivos y fluidos corporales, sin embargo la forma más abundante es el de la IL-1 $\beta$ .

El antagonista del receptor de la IL-1, el IL-1Ra, también es secretado, sin embargo se han encontrado que existen formas que son retenidas en el interior de las células (iIL-1Ra),

probablemente por carecer de péptido señal, aunque es pertinente indicar que son funcionalmente indistinguibles (Haskill, et al 1991).

La homología en la secuencia de aminoácidos (aa) entre la IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  es de 22 %, IL-1 $\alpha$  con el IL-1Ra es de 18 %, mientras que con la IL-1 $\beta$  es del 26 % (Dinarello 1994b). La homología de la IL-1 $\beta$  entre varias especies está en un rango de 75 a 78 % y de la IL-1 $\alpha$  es del 60-70 % (Dinarello 1989a), lo que puede explicar la ausencia de la restricción especie específico, entre ratón y humano.

Por ensayos de mutación dirigida en proteínas de la IL-1, se ha establecido que existen dos sitios, A y B, que son fundamentales para la unión al receptor. El sitio de unión A de la IL-1 $\beta$  consta de Tyr-16, Glu-20, Try-34, Glu-36 y Try-147, región que la comparte con el IL-1Ra (Evans, et al 1995). El sitio B para esta misma molécula esta compuesto por Arg-4, -lys-92/Lys-94, Gln-48/Glu-51, Lys-103 y Glu-105, sitio que no esta presente en el IL-1Ra, razón por la cual se considera el sitio responsable de desencadenar la activación del receptor de IL-1 (Evans, et al 1995).

Los principales productores de esta molécula eran los macrófagos tanto en humano como en ratón (Kovacs, et al 1987), aunque también son sintetizados por los neutrófilos, linfocitos T y B, keratinocitos, células de rata, microglías, células endoteliales, fibroblastos, células epiteliales y células mesenquiales de riñón. Se ha establecido que los macrófagos son las células con el más alto potencial para la producción de IL-1, ya que bajo estímulos adecuados, producen hasta 100 ng/millón de monocitos (Lisi, et al 1987). Por otro lado es pertinente señalar que en monocitos existe una producción 20 veces mayor de la IL-1 $\beta$  que de la IL-1 $\alpha$ , sin embargo se ha observado que los keratinocitos expresan de 2 a 4 veces más IL-1 $\alpha$  que IL-1 $\beta$  (Kobayashi et al 1989).

Existen varios agentes que promueven la expresión del gen de la IL-1, sin embargo es conveniente resaltar que el LPS, el PMA, y citocinas como la propia IL-1, IL-6 e IFN, son los principales factores que inducen la expresión del gen de la IL-1.

Los inductores como el LPS y el PMA han sido usados para dilucidar los principales regiones promotoras de la inducción a la expresión del gen de la IL-1 $\beta$  y del IL-1Ra. De

estos estudios se estableció que el gen de la IL-1 $\beta$  tiene una región potenciadora de la transcripción entre el nucleótido -3134 a -2729, conocida como secuencia de inducción río arriba (USI) (Crump, et al 1992, Dudding, et al 1989). El segmento USI se ha dividido en regiones B, C, D, E, F, G, H e I, los cuales parecen fijar diferentes factores de transcripción. La construcción de vectores CAT que contienen las diferentes regiones USI acoplados al promotor del oncogen c-fos, permitió dilucidar la participación en la transcripción de cada región. Así se ha establecido que la región B-C es un segmento de sinergia para la transcripción inducida por el PMA. La región D-G es indispensable para la promoción de la transcripción promovida por el LPS o PMA y la región I, es indispensable para la transcripción promovida por el LPS. La región H parece ser una región inhibidora de la transcripción ya que su eliminación, favorece en más de 10 veces la transcripción (Auron and Webb, 1994). La región E y la I parecen ser segmentos de fijación para el factor nuclear de IL-6 acoplado al factor de transcripción CREB (NF-IL6-CREB), mientras que en la región I se une el factor nuclear kB (NF-kB). La región F fija una proteína denominada NF-b1 (Shirakawa, et al 1993) cuando las células son estimuladas con LPS, se sospecha que esta proteína está relacionada con la familia de las proteínas Stat 1, ya que estas proteínas se fijan a la secuencia de activación del IFN- $\gamma$  tipo II (Auron and Webb, 1994). De comprobarse que NF-b1 pertenece a la familia de las Stat se estaría estableciendo una ruta de activación común para la transcripción del gen de la IL-1 promovida por el LPS y el IFN- $\gamma$ .

La región USI parece ser una región promotora de la transcripción independiente del tipo celular, existen otras regiones que parecen conferir la transcripción de la IL-1 de manera célula-específica, esta región está comprendida entre el nucleótido -131 a +1, por tanto incluye a la caja TATA. En este segmento al menos existe dos regiones de fijación del NF-IL6, que al parecer forma heterodímeros con el NF-kB para esta unión, la primera se localiza entre la posición -99 a la -59 y la segunda en o junto a la región TATA (Auron and Webb, 1994). Entre la región -131 a la -99 y río abajo de la -59 tienen la propiedad de fijar proteínas como Spi-1/PU.1 (Auron and Webb, 1994), proteínas caracterizadas por regular la expresión de genes célula específicos, particularmente restringidas a células como monocitos, mielocitos, células T y células B (Scott, et al 1994). Células que carecen de la proteína PU.1 como las HeLa, no inducen la transcripción de genes de IL-1, pero la

transfección de genes para PU.1 revierten esta propiedad (Smith, et al 1992b), por tanto esta región parece regular la expresión célula específica de la IL-1. Por otro lado existen estudios que indica que las secuencias del exón 1 y 2, incluyendo el intrón 1 son regiones que pueden fijar NF-IL6 y NF-kB, ya que su eliminación inhibe la transcripción del gen de la IL-1 $\alpha$  célula específica en al menos 20 veces (Mora, et al 1990). Finalmente, las posiciones +146 a la +152, región correspondiente al intrón 1, al ser insertados estos nucleótidos en vectores que contiene tres sitios en batería para la fijación del NF-kB, reducen la transcripción del vector transferido en monocitos humanos hasta en un 1 % (Auron and Webb, 1994). Esta región es rica en secuencias TC/GA, segmentos que se les conoce como silenciadores transcripcionales en varios genes (Kakkis, et al 1989). Esta secuencia de nucleótidos también son observados entre la región UIS (sitio -2729) y la región proximal del promotor (sitio -1931) del gen de la IL-1 $\beta$  (Gray, et al 1993). La región H y segmentos TC/GA pueden ser los controladores estrictos de la transcripción y esta puede ser una explicación del porque las células macrofágicas sin ningún estímulo, no transcriben el gen de la IL-1.

Cuando los monocitos son exitados por el LPS, los RNA mensajeros (RNAm) para IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  son detectados 15 minutos después del estímulo, se sostiene por 4 horas y cae (Fenton, et al 1988), mientras que la inducción por la propia IL-1 los niveles de RNAm se mantienen por 24 horas (Schindler, et al 1990a). También se observa una vigorosa transcripción después de la adherencia al sustrato de cultivo, sin embargo llama la atención que no ocurra la traducción a proteína del RNAm de IL-1 $\beta$  pero sí una degradación acelerada, la adición de LPS o IL-1 elimina el bloqueo de la traducción (Schindler, et al 1990b, Kaspar and Gehrke, 1994).

Por estudios de inmunoprecipitación no se detecta a la IL-1 en el retículo endoplásmico, Golgi, ni otros organelos, por lo tanto se considera que las proteínas recién sintetizadas de proIL-1 $\alpha$  y proIL-1 $\beta$  permanecen en el citosol, presumiblemente por carecer de un péptido señal. La proIL-1 $\alpha$  se considera que es una forma anclada a membrana, ya que prácticamente no se detecta en circulación ni en fluidos inflamatorios (Stevenson, et al

1993). Se supone que la IL-1 $\alpha$  es cortada por proteasas extracelulares y de esta forma se tiene la IL-1 $\alpha$  madura de 17,000 daltones (Thornberry, et al 1992).

La proIL-1 $\beta$  sale de la célula pero es escasamente activa, la forma madura de 17,000 daltones es generada cuando la proIL-1 $\beta$  es cortada por una proteasa de cisteína específica que reconoce al ácido aspártico-alanina en la posición 116-117 (Thornberry, et al 1992, Cerretti, et al 1992). Esta enzima se le denomina enzima convertidora de la interleucina (ICE) (Thornberry, et al 1992, Wilson, et al 1994). Cabe señalar que la ICE no se ha demostrado que tenga la capacidad de cortar a la IL-1 $\alpha$ , pero su ausencia influye negativamente en la secreción de la IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (Kuida, et al 1995), aun no se encuentra la explicación de como ocurre esta modulación.

La proIL-1Ra tiene un péptido señal, así que es trasladada al Golgi, procesada y empaquetada en vesículas de secreción para su traslado a la membrana y liberada al medio extracelular en forma de IL-1Ra soluble (sIL-1Ra), sin embargo se han detectado formas que carecen de péptido señal de tal suerte que quedan atrapados en el citosol (icIL-1Ra) (Haskill, et al 1991, Arend, 1993).

#### Receptores para la IL-1.

Se conocen dos tipos de receptores para la IL-1; IL-1RI e IL-1RII, aunque ambos son glicoproteínas, el primero tiene un peso molecular de 80,000 mientras que el segundo es de 60,000 daltones. Los dos receptores cuentan con una región extracelular de 325 aa con tres dominios tipo inmunoglobulina, una región transmembranal y un tallo citoplasmático. La región citoplasmática para el IL-1RI es de 215 aa (Sims, et al 1988), mientras que el de IL-1RII sólo consta de 29 aa (McMahan, et al 1991). Cabe señalar que también se han encontrado formas solubles de ambos receptores (Symons, et al 1991).

Ambos receptores fijan IL-1 con alta afinidad en células transfectadas con genes de ambos receptores (McMahan, et al 1991, Slack, et al 1993). Cada receptor es monomérico y fija un sólo ligando (Dower, et al 1994, Slack, et al 1993), aunque es pertinente señalar que la IL-1 $\alpha$  y el IL-1Ra tienen alta afinidad por el IL-1RI, este último ligando se une en forma casi irreversible a su receptor ( $K_a = 1 \times 10^{10} M^{-1}$ ) (Sims, et al 1994), mientras que la IL-1 $\beta$

muestra alta afinidad por el IL-1RII (Scapigliati, et al 1989), sin embargo también se une al IL-1RI.

El gen del IL-1RI no tiene caja TATA por lo que se considera un gen de expresión continua, aunque a bajos niveles, pero en casi todos los tipos de células (Ye, et al 1993), esto se correlaciona con datos obtenidos en los que se observa que la ocupación de sólo 2 a 3 % de los receptores son suficientes para una eficiente traducción de señales (Gallis, et al 1989, Ye et al 1992). Sin embargo, las células tratadas con ésteres de forbol, IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-2, IL-4, vitamina D3, PGE2, y el PDGF incrementan el número de receptores IL-1RI (Koch, et al 1992, Ye et al 1992).

El IL-1RII también se expresa en muchas células aunque predomina en neutrófilos, monocitos y linfocitos B (Dower, et al 1994). Las células tratadas con factores de crecimiento hematopoyético, corticosteroides, IL-1, PGE2 e IL-4, que son factores con niveles comúnmente incrementados en los procesos inflamatorios, incrementan la expresión del IL-1RII (Dower, et al 1994)

La homología de la porción extracelular entre ambos receptores es del 26 a 28 % (Berger, et al 1994). Sin embargo, llama la atención que el uso de anticuerpos anti-IL-1RI bloquea la acción biológica de la IL-1, pero no ocurre lo mismo cuando se emplean anticuerpos contra el receptor tipo II (Stylianou, et al 1992, McKean, et al 1993, Sims, et al 1993). Coincidentemente el receptor tipo II es sintetizado en células como los neutrófilos en presencia de IL-4 e inhiben la red de producción de citocinas promovida por la IL-1 (Colotta, et al 1993, Re, et al 1994), recientemente se ha publicado que no es capaz de promover la traducción de señales (Stylianou, et al 1992, Sims, et al 1993). Estos datos señalan que el IL-1RII parece ser un regulador negativo de la acción de la IL-1. Esta observación parece reafirmarse por el hecho de que el sIL-1RII se une preferentemente y en forma irreversible a la IL-1 $\beta$  y curiosamente este receptor soluble se incrementa 100 pM (picomolar) mientras que la IL-1 $\beta$  lo hace en 25 pM en suero de pacientes con infecciones severas. Algunos virus como el de vaccinia portan un gen, el B15R, que codifica para una proteína con 30 % de homología con el IL-1RII (Spriggs, et al 1992, Alcamí and Smith 1992), proteína que fija IL-1 y disminuye la habilidad del huésped para desarrollar una respuesta inflamatoria adecuada.

En resumen, la IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se unen al IL-1RI y parece ser el único receptor capaz de promover su actividad biológica, mientras que el receptor IL-1RII en forma soluble o adherido a membrana, fija preferencialmente IL-1 $\beta$ , pero sin estimular a la célula. El antagonista IL-1Ra se fija preferencialmente al receptor IL-1RI por tanto bloquea la fijación de cualquier otro ligando y así bloquea la actividad biológica de la IL-1

**Transducción de señales mediadas por el receptor de la IL-1.**

A pesar de que el IL-1RI tiene un tallo citoplásmico de 213 aa, ninguno parece servir como sustrato para tirosina cinasas. Sin embargo, se ha observado que pocos minutos después de iniciada la estimulación celular con IL-1, en ausencia de la hidrólisis de fosfatidilinositol, o incremento de calcio intracelular, se activan proteínas fijadoras de GTP (O'Neill, et al 1990), fosfolipasa C (PLC) (Rosoff, et al 1988), esfingomielinasa con la consecuente liberación de ceramida (Mathias, et al 1993), y excitación de la proteína activadora de fosfolipasa A2 (PLAP) (Figura 4) (Gronich, et al 1994).

Algunos autores proponen que la activación de PLC degrada a la fosfatidilcolina para generar diacilglicerol (DAG), una molécula que estimula a la proteína cinasa C (PKC), y es probable que las PKC finalmente activan a las proteínas cinasas excitadas por mitógeno (MAP-K) (Guesdon, et al 1993, Bird, et al 1991).

La IL-1 y el TNF tienen rutas de activación similar a pesar de que sus receptores son independientes (Kolesnick and Golde, 1994, Brakebusch, et al 1992), bajo esta premisa, algunos reportes establecen que la ceramida, activa una proteína cinasa de 97,000 daltones cuando las células son estimuladas con TNF y que ésta fosforila a la proteína de 38,000 daltones (p38 cinasa), un miembro de las MAP-K (Freshney, et al 1994, Han, et al 1994, Liu, et al 1994), incluso se propone que puede ejercer un efecto directo en la fosforilación del inhibidor del factor nuclear kB (I $\kappa$ B) (Schutze et al 1994).

Se desconoce como y que tipo de MAP-K fosforilan a los factores nucleares como c-fos-c-jun, NF-kB y el NF-IL6, pero es un hecho que las células estimuladas con IL-1 después de 5 minutos ocurre una fosforilación del inhibidor del factor de transcripción NF-kB (I $\kappa$ B) (DiDonato, et al 1995) acompañado de la traslocación del NF-kB al núcleo (Stylianou, et al 1992). La IL-1 no sólo favorece la traslocación del NF-kB, NF-IL6 y de la proteína de

## RUTAS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES POR LA IL-1.

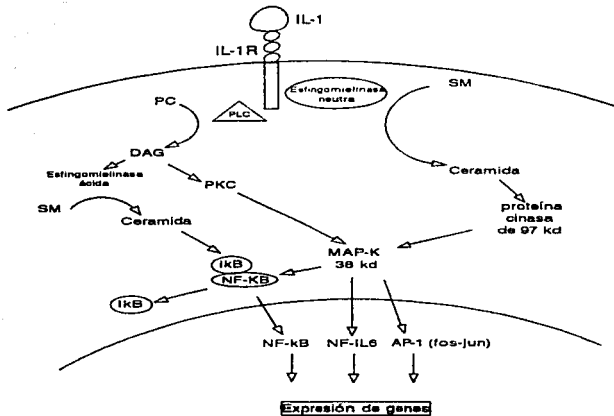


Figura 4. Vía de activación desencadenada por la IL-1. PC, Fosfatidil colina; PLC, Fosfolipasa C; DAG, Diacil-glicerol; SM, Esfingomielina; PKC, Proteína cinasa C; MAP-K, Proteína cinasa activada por mitógenos; NF-kB, Factor nuclear kapa beta; IκB, Inhibidor del factor nuclear; NF-IL6, Factor nuclear de interleucina 6; AP-1, Proteína activadora-1 (modificado de Schütze, et al 1994).



activación 1 (AP-1) para la transcripción de genes inducibles por IL-1, sino que también activa a dos factores nucleares (jun-1 y jun-2) los cuales se fijan al promotor del gen c-jun para estimular su transcripción (Muegge, et al 1993).

Una de las proteínas que fijan GTP es Ras, la que fosforila a Raf y ésta fosforila a la serie de MAP-K, que es una ruta de activación común para el receptor de IL-6 y de los CR y RTK (Luttricken, et al 1994, Stahl, et al 1994). Si el IL-1RI activa proteínas que fijan GTP, esta podría ser Ras, incluso se ha propuesto que puede ser una vía común de la activación entre IL-1 e IL-6 (Kishimoto, et al 1994). Por otro lado la proteína tirosina cinasa JAK2 se une al receptor exitado de IL-6 y es la cinasa responsable de la fosforilación y activación de factores de transcripción que responden al interferon (IRTF). El gen de la IL-1 tiene regiones de fijación para los IRTF, considerando que la IL-1 es capaz de inducir la expresión de su propio gen, entonces también existe la posibilidad que utilice la ruta de activación de JAK2 para este fin. lo que hace pensar que puede ser una vía general de la señalización para IL-1, CR y RTK

#### **Efectos biológicos de la IL-1.**

Existe una lista impresionante de los efectos biológicos mediados por la IL-1, a continuación sólo se enunciarán brevemente algunos de ellos.

La IL-1 tiene la propiedad de inducir la expresión de genes, particularmente de las prostaglandinas, leucotrienos y óxido nítrico. También induce la expresión de genes de la IL-8, su propio gen (Dinarello, et al 1987) y de proto-oncogenes como c-fos y c-jun (Muegge, et al 1993). Por otro lado favorece la estabilización de RNAm mensajeros como el del GM-CSF (Ernst, et al 1989, Griffin et al, 1990). Sin embargo, parece regular negativamente la expresión de genes como el de la albúmina y del citocromo p450 (Ghezzi, et al 1986)

Los efectos letales de las toxinas de microorganismos, capaces de provocar la muerte, puede revertirse si se adiciona anti-TNF (Tracey, et al 1987) o el IL-1Ra (Alexander, et al 1991), incluso se ha observado que la inoculación de estas mismas moléculas reduce la muerte de pacientes con síndrome de choque séptico (Bone, 1993), esto implica que una sobreproducción tales citocinas pueden mediar la autodestrucción del propio huésped. Se ha observado que la inyección de IL-1 provoca cuadros de choque séptico e incluso la muerte.

razón por la cual se ha establecido la dosis límite de toxicidad de IL-1 es de 300 ng/ml por paciente (Smith, et al 1992).

La IL-1 inhibe las contracciones del músculo liso de la pared vascular (Beasley, et al 1989), y ocurre lo mismo en miocitos del corazón *in vitro*, actividad que es revertida por el TGF- $\beta$  (Roberts, et al 1992). La producción del óxido nítrico inducida por IL-1 es la responsable de la inhibición de la contracción cardíaca (Beasley, et al 1991, Finkel, et al 1992).

A nivel de sistema nervioso central, la IL-1 actúa como un poderoso pirógeno (Tewari, et al 1990). Se han detectado IL-1R distribuidos a través del hipotálamo y estos receptores se localizan sobre las proyecciones neuronales entre las expansiones de las células endoteliales que constituyen la barrera hemato-encefálica, de forma tal que las neuronas reciben un estímulo directo de la IL-1 externa, sin olvidar que las células gliales y al parecer las propias neuronas producen IL-1 (Cocconi, et al 1988). La IL-6, la IL-11 y el factor neurotrófico ciliar (CNTF) también producen fiebre (Shapiro, et al 1993), sin embargo en los cuadros de febriles en el líquido cefalorraquídeo (fluido-cerebro-espinal), donde la concentración de IL-6 esta elevada, una inyección del IL-1Ra bloquea la fiebre y reduce los niveles de la propia IL-6 inducida por endotoxinas (LeMay, et al 1990). Lo anterior indica que la IL-1 es la responsable directa de provocar la fiebre.

La IL-1 induce un incremento de 2 a 3 veces mayor de la síntesis de proteínas hepáticas normales y de 100 a 1000 veces de las proteínas que participan en la reacción de la fase aguda inflamatoria como fibrinógeno, componentes del complemento, factor B, metalotioneínas y de varios factores de coagulación (Ramadori, et al 1985, Ghezzi, et al 1986). La expresión de estas moléculas también es modulada por la IL-6, LIF y el factor neurotrófico ciliar, sin embargo la IL-1 ejerce este efecto en forma independiente de dichos factores (Dinarello 1994a).

La IL-1 promueve la proteólisis (Moldawer, et al 1988), pero algunos datos contradicen este fenómeno ya que la administración de IL-1 con el TNF reduce la pérdida de la masa corporal (Flores, et al 1989). La IL-1 adicionada a los cultivos de hueso, induce un proceso severo de resorción ósea y reducción de la matriz de la misma, proceso que se ve

sinergizado cuando se adiciona TNF (Feige, et al 1989). La IL-1 favorece la proliferación de los osteoblastos, así como la síntesis de PGE2 y del factor activador del plasminógeno, por estas mismas células (Evans, et al 1990). La destrucción del hueso y cartilago son los signos característicos de la artritis reumatoide (AR) y osteoartritis. La IL-1 es un potente inhibidor de la síntesis de glicosaminoglicanos y colágena, componentes de la matriz extracelular y constituyentes de los cartilagos. Por otro lado la IL-1 también induce la síntesis de metaloproteasas y gelatinasas las cuales contribuyen a la destrucción del cartilago (Krane, et al 1990, Dayer, et al 1986). El principal blanco de la IL-1 en la artritis son los fibroblastos de la sinovial humana, no sólo para favorecer su proliferación sino que además induce la síntesis de PGE2 y proteinasa, y el uso de los inhibidores de la ciclooxigenasa reducen la lesión en la artritis (Krane, et al 1990, Dayer, et al 1986).

En los pacientes con AR se encuentran niveles altos de IL-1 y al suministrarles el IL-1Ra se reduce la inflamación (Chomarat, et al 1995). Las citocinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-13, IL-10, ejercen este efecto por el incremento en la producción de IL-1Ra (Chomarat, et al 1995), además la IL-4 induce la producción del IL-1RII, un receptor que bloquea la acción de IL-1 (Re, et al 1994). La IL-1 es uno de los principales factores inflamatorios en los padecimientos articulares (Chomarat, et al 1995). La IL-1 es un agente quimiotáctico para granulocitos (Colotta, et al 1993) los cuales participan en la inflamación y contribuyen en la exacerbación de las lesiones.

La IL-1 induce la proliferación de los keratinocitos, fibroblastos, células mesenquiales, células del músculo liso, células gliales y algunas células tumorales (Kohase, et al 1987, Libby, et al 1988). La IL-1 contribuye al desarrollo de la fibrosis en pacientes con efisema pulmonar (Lonnemann, et al 1995), así como en la fibrosis de médula ósea de algunos pacientes con leucemia linfoblástica crónica (Kimura, 1993). La caracterización de la enzima convertidora de la IL-1 (ICE), y su transfección a fibroblastos, permitió establecer que la IL-1 también colabora en la promoción de la apoptosis de estas células (Miura, et al 1993). La IL-1 promueve la muerte celular programada en las neuronas (Gagliardini, et al 1994) y en células  $\beta$  productoras de insulina (Bendtsen, et al 1986).

La IL-1 afecta la proliferación de células hematopoyéticas (hemopoyetina-1), mediada por la inducción de la producción de los factores hematopoyéticos como el GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-3, IL-6 e IL-1 por las células estromales de médula ósea humanas o de ratón. (Bagby, 1989, Fibbe and Falkenburg, 1990, Zsebo, et al 1988), este incremento de la producción de citocinas puede ser consecuencia de la estimulación a la transcripción de RNAm o por la estabilización del RNAm, como ocurre con el GM-CSF (Griffin, et al 1990). La IL-6, G-CSF, GM-CSF, IL-3 y el SCF no son capaces de inducir la formación de colonias a partir de las células formadoras de colonias de alto potencial proliferativo (HPP-CFC), pero en presencia de IL-1, o IL-1 más IL-6 si ocurre la proliferación de este tipo de precursores (Jacobsen et al 1994a). La IL-1 también favorece la sobrevivencia de los precursores mieloides (Johnson, et al 1989). Con la inyección de menos de 1 ug/ml de IL-1 en animales y humanos incrementa el número de los granulocitos circulantes (Ulrich, et al 1987), pero con dosis altas se desencadena una granulocitopenia (Shieh, et al 1990). La inyección de IL-1 en primates, a diferencia del GM-CSF, provoca una mayor liberación al torrente sanguíneo de células seminales hematopoyéticas (Gasparetto, et al 1990). La participación de la IL-1 en la proliferación de células eritroides parece ser confuso sin embargo se ha demostrado que induce la proliferación de las células precursoras eritroides a partir de células precursoras hematopoyéticas de sangre periférica CD34<sup>+</sup>, efecto que es revertido por el IL-1Ra (Aoki, et al, 1995). Las múltiples propiedades de la IL-1 permiten considerarla como rectora de la expresión de citocinas, al menos en el contexto de la hematopoyesis (Bagby, 1989).

La IL-1 modifica la actividad de las células linfoides, de hecho uno de los nombres que recibió este factor antes de llamarle IL-1 fue el de "Factor Activador de Linfocitos". Se ha establecido que la IL-1 actúa como un coestimulador a dosis bajas de mitógenos o antígenos, por otro lado amplifica la respuesta de linfocitos T porque induce la expresión del gen de la IL-2 y su receptor (IL-2R) (Simic, et al 1985). Datos recientes indican que la IL-1 parece ser fundamental para inducir la expresión de la IL-2 en células T aún antes de la expresión del receptor de células T (TCR) (Rothenberg, et al 1990). La estimulación a la proliferación de células T por la IL-1 es sinergizada por la presencia de IL-6, evento que puede ser válido para las células B. Es probable que la IL-1 no sea un mitógeno importante

para este grupo de células, pero favorece la acción de otras citocinas. Se ha establecido que la estimulación para montar la respuesta inmune por los linfocitos T no ocurre en forma normal si la IL-1 no esta presente (McKean, et al 1994). Faltan estudios para dilucidar la relevancia de la IL-1 en la activación de las células linfocíticas, el uso de ratones deficientes en el gen de la IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (ratones knock out) pueden ser de gran utilidad.

Es pertinente señalar que la IL-1 y el TNF, comparten actividades biológicas similares, incluso cuando ambos factores son usados en combinación se muestra un fuerte efecto sinérgico (Okusawa, et al 1988, Flores, et al 1989), sin embargo sus receptores y la estructura proteica son diferentes. La actividad biológica compartida por ambas citocinas se puede entender a nivel de las señales de los segundos mensajeros, en la cual ambas citocinas usan la misma ruta (Schütze, et al 1994). Aunque la IL-1 parece regular negativamente la expresión de los receptores para TNF (Holtmann and Wallack, 1987).

Otra citocina que traslapa muchas de las actividades de la IL-1, es la IL-6, de hecho algunos datos refieren que hay una mejor correlación entre IL-6 con la aparición de fiebre, por tanto se le puede considerar como la principal responsable de esta actividad, sin embargo datos como la inyección de 30 ug/kg en humanos no produce hipotensión (Smith, et al 1992a) por lo que al parecer la IL-6 no es letal a diferencia de la IL-1. La inyección de anti-TNF (Fong, et al 1989), o IL-1Ra *in vitro* (Granowitz, et al 1992) e *in vivo* (Henricson, et al 1991) reduce considerablemente la producción de IL-6. También se ha reportado que después de la inyección de IL-6 se observa una fuerte producción de IL-1Ra (Tilg, et al 1994), además la IL-6 inhibe la producción de IL-1 inducida por LPS y TNF (Schindler, et al 1990), por tanto se considera a la IL-6 como una citocina anti-inflamatoria ya que promueve la producción del IL-1Ra, y produce anti-proteasas, moléculas que pueden inhibir la generación de las formas maduras de las IL-1 (Tilg, et al 1994).

La participación de la IL-1 en los procesos de diferenciación celular han sido poco estudiadas, tanto así que en los artículos de revisión, este enfoque no ha sido discutido (Bagby et al 1989, Crown, et al 1995, Dinarello, 1994b). No obstante, existen algunos reportes que señalan la probable participación de la IL-1 en el proceso de diferenciación celular. Se ha observado que la IL-1 $\alpha$  promueve el fenotipo maduro de células endoteliales jóvenes, y las células endoteliales senescentes ya no se dividen porque expresan

constitutivamente a la IL-1 $\alpha$ , pero éstas pueden adquirir una morfología de células jóvenes y ser capaces de proliferar cuando se impide la traducción del RNAm para la IL-1 $\alpha$  (Maier, et al 1990).

En el contexto de la hematopoyesis, tampoco existen muchos datos sobre la participación de la IL-1 en la diferenciación celular mielóide o linfóide. Sin embargo, algunos estudios señalan que induce la expresión de IL-2 y su receptor en linfocitos (McKean, et al 1993). En relación a las células mieloides la IL-1 induce la expresión de factores hematopoyéticos como GM-CSF, G-CSF, IL-3 o M-CSF (Shaw and Kamen, 1986). La IL-1 combinada con el TNF ejercen un efecto supresor en la hematopoyesis (Gasparetto, et al 1989), aunque se ha observado que la IL-1 sólo tiene esta actividad, incluso se le ha considerado como un agente antineoplásico (Onozaki, et al 1988). El efecto supresor de la hematopoyesis puede deberse a la inducción a la diferenciación celular, particularmente por su capacidad de inducir la expresión de receptores Fc (Fc $\gamma$ R) (Onozaki et al 1987, 1988)

## RECEPTORES Fc

Hace más de 30 años que se describió la existencia de receptores celulares capaces de fijar la fracción cristalizable (Fc) de la molécula de inmunoglobulina, a los cuales se les denominó Receptores Fc (FcR, del Inglés Fc Receptor) (Boyden and Sorkin, 1960). Estos receptores se expresan en todas las células del sistema inmune y tienen especificidad por diferentes isotipos de inmunoglobulina, así tenemos FcR para la IgG (Fc $\gamma$ R), IgE (Fc $\epsilon$ R), IgD (Fc $\delta$ R), IgM (Fc $\mu$ R) e IgA (Fc $\alpha$ R) (Mellman, et al 1988). De todos los FcR sólo los Fc $\gamma$ R y Fc $\epsilon$ R de leucocitos han sido ampliamente caracterizados. Esta revisión se centrará sobre las características y actividad biológica de los Fc $\gamma$ R.

Los Fc $\gamma$ R juegan un papel importante en la inmunidad y resistencia a las infecciones, estos conforman un grupo de moléculas que permiten la interacción entre el complejo antígeno-anticuerpo y las células efectoras responsables de la eliminación de los agentes patógenos. Cabe señalar que entre las células efectoras más relevantes tenemos a los macrófagos, granulocito-neutrófilos y eosinófilos (Fanger, et al 1989b). Estas moléculas por ser expresadas en células maduras, han sido empleadas como marcadores de diferenciación en las células hematopoyéticas, junto con la producción de lisozima y la fagocitosis (Ruhl and Pluznik, 1993)

### Características de los Fc $\gamma$ R.

Hasta el momento se han descrito en el ratón y en humanos tres diferentes tipos de Fc $\gamma$ R: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII (Ravetch and Anderson, 1990). Todos los Fc $\gamma$ R son glicoproteínas compuestas de una subunidad  $\alpha$  (Figura 5), aunque el Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIII se complementa con un dímero de la subunidad  $\gamma$ , y particularmente el Fc $\gamma$ RIII puede formar heterodímeros con una tercera subunidad conocida como cadena  $\zeta$  ( $\gamma$ - $\zeta$ ) (Figura 5). La subunidad  $\alpha$  tiene tres regiones; una extracelular, una transmembranal y una citoplasmática, mientras que la cadena  $\gamma$  o  $\zeta$  sólo tiene dos; la transmembranal y la citoplasmática. La subunidad  $\alpha$  en el Fc $\gamma$ RII y las  $\gamma$  o  $\zeta$  en los Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIII son las responsables de la transducción de señales (Ravetch and Anderson, 1990, Ravetch, 1994). En los tres tipos de Fc $\gamma$ R la cadena  $\alpha$  es la

## Fc $\gamma$ R

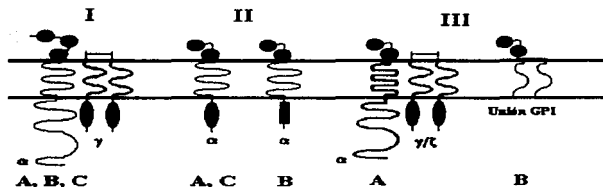


Figura 5. Proteínas que integran la familia de los Fc $\gamma$ R. Las cadenas  $\alpha$  constituyen las proteínas tradicionalmente conocidas como los Fc $\gamma$ R y son las únicas que tienen un dominio extracelular (esferas), transmembranal y un citoplasmático. El Fc $\gamma$ R I es codificado por tres genes al igual que el Fc $\gamma$ R II (A,B,C), mientras que el Fc $\gamma$ R III sólo por dos (A,B). Las cadenas  $\gamma$  y  $\zeta$  permiten que se ancle a la membrana, además se portan los segmentos de activación por receptores antígenicos (ARAM's) (cilindros), indispensables en la transducción de señales (tomado de Ravetch, 1994).



responsable de la fijación del ligando. Esta subunidad tiene dominios tipo inmunoglobulinas (Ig), por tanto son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Los dominios extracelulares de las subunidades  $\alpha$  son altamente conservados ya que tienen un rango de identidad del 70 al 98 % en el grupo de los Fc $\gamma$ R humanos (Ravetch, 1994). En general los tres tipos de Fc $\gamma$ R interactúan con todas las subclases de IgG, aunque existen diferencias en su afinidad. El Fc $\gamma$ RI fija IgG monomérica con alta afinidad mientras que el Fc $\gamma$ R II y el Fc $\gamma$ R III fijan IgG con baja afinidad (van de Winkel and Capel, 1993).

#### Fc $\gamma$ R I

El Fc $\gamma$ R I humano (antígeno CD64) es una glicoproteína de 72,000 daltones (Anderson, et al 1986, Peltz, et al 1988) mientras que el de ratón es de 70,000 daltones (Quilliam, et al 1993). La clonación del cDNA del Fc $\gamma$ RI ha revelado que tiene una región extracelular de tres dominios como de Ig a diferencia del Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. El tercer dominio de este receptor es distinto a los dos primeros los cuales son homólogos entre los tres tipos de Fc $\gamma$ R. Gracias al tercer dominio, el Fc $\gamma$ RI fija IgG monomérica con alta afinidad (Hulett, et al 1991).

Se han reconocido tres genes para el Fc $\gamma$ R I humano (hFc $\gamma$ RI): hFc $\gamma$ RIA, hFc $\gamma$ RIB, y hFc $\gamma$ RIC (Ernst, et al 1992). Los tres genes, todos localizados en el cromosoma Iq21.1, tienen un alto grado de similitud ya que contienen una estructura idéntica de intrones y exones, todos están constituidos por 6 exones, 2 para la región 5' no traducida y la señal líder, un exón para cada dominio y otro para la región transmembranal, citoplasmática y la región 3' no traducida (Osman, et al 1992, Dietzsch, et al 1993).

El producto del gen hFc $\gamma$ RIA es el hFc $\gamma$ RIa de 72,000 daltones, es el único receptor integrado a membrana con los tres dominios como de Ig. Los genes hFc $\gamma$ RIB y hFc $\gamma$ RIC tienen un codón de terminación en el exón que codifica el tercer dominio extracelular, por tanto sus transcritos, el hFc $\gamma$ RIB1 y Ic respectivamente, al parecer codifican para receptores solubles, aunque a nivel de la proteína no han sido detectados (Dietzsch, et al, 1993). Se ha demostrado que el hFc $\gamma$ RIB puede sufrir un empalme alternativo por la eliminación del exón que codifica para el tercer dominio, generando un producto de sólo 2 dominios (Porges, et

al., 1992). Su transfección en células COS permite expresar la proteína (hFcyRIb2) la cual sólo fija agregados de IgG (Porges, et al 1992).

En el ratón ha sido aislado un gen simple que codifica para un producto homólogo al hFcyRIa, el mFcyRI, tiene una región extracelular de 273 aa constituido por tres dominios como de Ig, una región transmembranal de 23 aa y un tallo citoplásmico de 84 aa. La secuencia de aa entre el hFcyRIa y el mFcyRI revela un 75 % de homología a nivel extracelular y transmembranal (Sears, et al. 1990, Quilliam, et al 1993). El gen para el mFcyRI, localizado en el cromosoma 3 del ratón, también comprende 6 exones con la misma estructura del hFcyRI (Osman, et al 1992).

Como se ha mencionado, el hFcyRI es el único receptor que fija IgG monomérica con una constante de afinidad ( $K_a$ ) de  $10^8$  a  $10^9 M^{-1}$  (Allen and Seed, 1989). El mFcyRI muestra las mismas características aunque la afinidad ( $K_a$ ) por su ligando es más reducida  $10^7$  a  $10^8 M^{-1}$  (Tabla 2) (Sears, et al 1990, Hulett, et al 1991).

#### CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DEL FcyRI.

Características	Humano	Ratón
Tamaño molecular	72,000 daltones	70,000 daltones
Localización cromosómica	1q21.1	3
Genes	3 (A, B, C)	1
Proteína	Transmembranal y receptores notables	Transmembranal
Asociación con	Hemolisinas de cadena y	Hemolisinas de cadena y
Homología humano-ratón	75 %	75 %
Afinidad por el ligando ( $K_a$ )	$1 \times 10^8$ a $1 \times 10^9 M^{-1}$	$1 \times 10^7$ a $1 \times 10^8 M^{-1}$
Especificidad por la IgG humana	IgG1, IgG3, en menor grado IgG4, pero no IgG2	IgG1, IgG3 pero no IgG2
Especificidad por la IgG de ratón	IgG2a, IgG3	IgG2a
Células que expresan el receptor	Monocito-macrófago	Monocito-macrófago
Normales		
Estimuladas con citoquinas	Neutrófilos, eosinófilos, monocito-macrófagos	Monocito-macrófago y neutrófilos

Tabla 2. Características de la cadena  $\alpha$  del receptor FcyRI (Datos tomados de Unkeles, et al 1988, Harnnell, et al 1992, Qiu, et al 1990, Erbe, et al 1990, Kerst, et al 1993, van de Winkel and Capel, 1993, Ravetch, 1994)

Tanto el hFcγRI como el mFcγRI muestran especificidad por algunas inmunoglobulinas. La molécula de origen humano muestra especificidad para hIgG1 e hIgG3, en menor grado para hIgG4 y no fija hIgG2 (Anderson and Abraham, 1980). También fija IgG de ratón (mIgG), con especificidad para el mIgG2a e IgG3 (van de Winkel and Capel, 1993). La fijación de agregados también parece ser similar a la especificidad de IgG monomérica (van de Winkel and Capel, 1993). En cuanto al receptor de ratón, fija específicamente mIgG2a y además hIgG1 y hIgG3, pero no hIgG2 (Sears, et al 1990)

Normalmente el hFcγRI se expresa sobre los monocitos y macrófagos, pero puede ser inducible en neutrófilo, eosinófilos y sobre los propios monocito-macrófagos cuando las células son tratadas con el IFN-γ (Tabla 2) (van de Winkel and Capel 1993), incluso se han caracterizado los elementos que, en respuesta al estímulo con el IFN-γ, se unen al promotor del gen para FcγRI (Bennech, et al 1992). La IL-10 parece también inducir la expresión de este receptor (Te Velde, et al 1990, 1992), mientras que la IL-4 la bloquea (Te Velde, et al 1990, 1992). Recientemente el G-CSF se ha sumado a la lista de moduladores positivos del FcγRI en los neutrófilos (Repp, et al 1991).

El mFcγRI de ratón ha sido más difícil establecer sobre cual tipo de células se expresa, aunque los monocitos y macrófagos si lo portan (Unkeles, et al 1979). El IFN-γ también modula positivamente la expresión de este tipo de FcγR en monocito-macrófagos (Sivo, et al 1993), y la IL-6 en una línea mielóide de ratón M1 (Ruhl and Pluznick, 1993).

Se han generado varios anticuerpos contra los hFcγRI, ya sean bloqueadores (Fr51, 10.1), o no, (32, 197, 44 y 62) del sitio de fijación del ligando (Hulett and Hogarth, 1994). No existen anticuerpos contra el mFcγRI.

#### FcγR II

El hFcγRII (antígeno CD32) es una glicoproteína de 40,000 daltones (Ierino, et al 1993). El mFcγRII de ratón tiene un rango de 40,000 a 60,000 daltones (Tabla 3) (Mellman and Unkeles, 1980, Hibbs, et al 1985).

La clonación de cDNA para el hFcγRII ha permitido identificar la existencia de 3 genes diferentes para este receptor, FcγRIIA, FcγRIIB y el FcγRIIC los cuales codifican para 6

diferentes transcritos (Quie, et al 1990). Los tres genes son similares en estructura y cada uno comprende de 8 exones; 2 exones codifican para la región no traducida del extremo 5' y la señal líder, un exón para cada dominio tipo Ig y la región transmembranal y tres exones codifican para el dominio citoplásmico y la región no traducida del extremo 3' (Quie, et al 1990)

El gen para el hFcγRIIA codifica para tres transcritos, dos se originan por empalme alternativo de la zona de poli-adenilación (RNAm de 1.4 y 2.4 kb) (hFcγR IIa1) y son formas ancladas a membrana (McKenzie, et al 1992), el tercero carece del exón que codifica para la región transmembranal (hFcγRIIa2) por lo tanto se considera la forma soluble del receptor (Astier, et al 1994).

El gen hFcγRIIB codifica tres diferentes transcritos (hFcγRIIB1, IIB2 y IIB3) generados por empalmes alternativos (Qiu, et al 1990). La isoforma hFcγRIIB2 es idéntica a la IIB1 pero carente del primer exón que codifica para la región citoplasmática (Qiu, et al 1990, Hogarth, et al 1991). La isoforma hFcγRIIB3 se origina como IIB1 pero sin el exón que codifica para el segundo péptido líder (Brook, et al 1989).

Para el gen hFcγRIIC sólo hay un transcrito, el hFcγRIIC, ha sido reportado ( Brook et al 1989).

En el ratón se ha descrito la existencia de un sólo gen para el mFcγRII del cual derivan tres diferentes transcritos, comúnmente denominados FcγRIIB1, FcγRIIB2 y FcγRIIB3, este último carece de la región transmembranal (Qiu, et al 1990, Hulett and Hogarth, 1994). A diferencia del gen para el FcγRII humano, el de ratón está constituido por 10 exones, 4 codifican para la secuencia no traducida del extremo 5' y 4 secuencias líder, un exón para cada dominio como de Ig y la región transmembranal y 3 para el dominio citoplásmico. El gen esta localizado en el cromosoma 1 junto al gen para el mFcγRIII (Davidson, et al 1983, Hibbs, et al 1985).

El mFcγRIIB2 se origina como el mFcγRIIB1, pero carece de la secuencia codificadas por el exón para el dominio 1 de la región citoplásmica. El mFcγRIIB3 es parecido al mFcγRIIB2 pero carece de la región transmembranal por lo que se le considera que es el mFcγRII

soluble (Qiu, et al 1990, Hagarth, et al 1991). La homología entre los FcγRII de ratón y humano es del 60 % en cuanto a secuencias de aa (Brook, et al 1989).

De los tres tipos de FcγR humanos, el hFcγRII es el que tiene una distribución más amplia, ya que se le encuentra sobre los monocitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células de Langerhans, plaquetas, células B y algunas clones de células T, pero no está presente en las NK (Schmitt, et al 1990, Sandor and Lynch, 1992, Mantzioris, et al 1993). También ha sido detectado en células trofoblásticas (Stuart, et al 1989) y células endoteliales de placenta (Tabla 3) (Sedmak, et al 1991). Con el uso de técnicas de electrotransferencia (nortnen blot) y de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se detectó que los megacariocitos expresan el FcRIIa1 y Ila2, las células B el FcγRIIb1, Iib2 y transcritos de FcγRIIc, y las células mielomonocíticas expresan todos las isoformas de los tres genes para FcγRII (Cassel, et al 1993).

#### CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DEL FcγRII.

Características	Humano	Ratón
Peso molecular	40.000 daltones	40.000 a 60.000 daltones
Localización cromosómica	1q23-24	1
Genes	3 (A, B, C)	1
Proteína	Transmembranal y receptores solubles	Transmembranal y receptores solubles
Asociación	No existe	No existe
Homología, homotiosianan	60 %	60 %
Afinidad por el ligando (Ka)	menor a $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$	menor a $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$
Especificidad por la IgG humana	IgG3, IgG1, en menor grado IgG4, pero no IgG2	IgG3, IgG1 y en menor grado IgG2
Especificidad por la IgG de ratón	IgG2a, IgG2b	IgG1, IgG2a
Células que expresan el receptor		
Normales	Monocito-macrófagos, eosinófilos, plaquetas, células cebadas, neutrófilos, megacariocitos, células T y B, células trofoblásticas y endoteliales de placenta.	Monocito-macrófagos, eosinófilos, plaquetas, células cebadas, neutrófilos, megacariocitos, células T y B, células trofoblásticas y endoteliales de placenta.
Estimuladas con citocinas	Eosinófilos y basófilos.	Se desconoce.

Tabla 3. Características de la cadena α del receptor FcγRII de ratón y humano (Datos tomados de Unkeles, et al 1988, Stuart, et al 1989, Sedmak, et al 1991, Harnell, et al 1992, Qui, et al 1990, Erbe, et al 1990, Kerst, et al 1993, van de Winkel and Capel, 1993, Ravetch, 1994)

La expresión del mFcγRII es de distribución amplia, incluyendo monocitos, macrófagos, neutrófilos, células cebadas, eosinófilos, plaquetas, células B y algunas T (Unkeles, et al, 1988, Mellman, et al 1988, Ravetch and Anderson, 1990). La isoforma mFcγRIIb1 se

expresa en el linaje monocito-macrófago y la mFcγRIIb2 es preferencialmente expresado en linfocitos B (Ravetch, et al 1986). El FcγRIIb3 se encuentra en forma soluble en el sobrenadante de cultivos de macrófagos (Tartour, et al 1993).

El nivel de la expresión del hFcγRII en eosinófilos y basófilos puede ser modulado por el IFN e IL-3 (Hartnell, et al 1992), pero en los neutrófilos, y en macrófagos parece no ser regulado por ningún tipo de citocina; sin embargo la IL-4 regula en forma negativa la expresión de este tipo de receptores Fc (Te Velde, et al 1990). La regulación de la expresión de FcγRII en células de ratón no ha sido estudiada.

Los anticuerpos monoclonales que reconocen al FcγRII de humanos son: el IV.3, KuFc76, 41H16, 2E1, KB61, AT10, 7.30, 8.7 y 8.26, los cuales se unen al receptor, justo en el sitio de interacción con el Fc de la IgG. Sólo dos anticuerpos monoclonales, el CIKM5 y 8.2, se unen fuera del sitio de unión de la IgG (Hulett and Hogarth, 1994), pero estos anticuerpos si bloquean la fijación de IgG (Ierino, et al 1993). Se ha descrito que anticuerpos como el IV.3, 8.26, 8.7, y 7.30 tiene su epitopo en el segundo dominio extracelular del hFcγRII, en tanto que el CIKM5 y el 8.2 se unen reconociendo parte de ambos dominios, por lo tanto se ha sugerido que en el dominio dos (Ch2) del receptor es la región que se une al ligando (Ierino, et al 1993).

Los anticuerpos 2.4G2 y el anti-Ly-17.2 reconocen el sitio de unión de la IgG para el FcγRII en ratón (Unkeles, et al 1979, Hibbs, et al 1985), pero el 2.4G2 también reconoce al FcγRIII de ratón (Hibbs, et al 1985).

### FcγR III

El receptor hFcγRIII (antígeno CD16) se reporta con un peso molecular de 50,000 a 80,000 daltones (Lanier, et al 1988). La heterogeneidad es por la fuerte glicosilación de dos isoformas; el hFcγRIIIa y hFcγRIIIb. En el ratón sólo se ha detectado una proteína con peso molecular heterogéneo de 40 a 80 Kd (Tabla 4) (Mellman, et al 1988).

Aunque el hFcγRIII es similar al hFcγRII en su forma de anclarse a la membrana, la isoforma hFcγRIIIb es el único receptor de este tipo que está unido a la hoja externa de la membrana

plasmática por una molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Kurosaki and Ravetch, 1989, Lanier, et al 1989).

Dos distintos genes, el Fc $\gamma$ R1IIIA y Fc $\gamma$ R1IIIB, han sido identificados, ambos localizados en el cromosoma 1 región q23-24 (Qiu, et al 1990), los cuales generan un transcrito para el hFc $\gamma$ R1IIa y hFc $\gamma$ R1IIb (Pelts, et al 1989). Los genes tienen 5 exones, 2 codifican para la secuencia no traducida 5' y dos secuencias líder, un exón para cada dominio como de Ig y un exón para la región transmembranal, citoplasmática y extremo 3' no traducida (Qiu, et al 1990)).

El receptor hFc $\gamma$ R1IIb difiere del hFc $\gamma$ R1IIa en el tallo citoplasmático, concretamente en la posición 203 donde el hFc $\gamma$ R1IIb tiene una serina la cual es específica para una unión GPI, contra una fenilalanina en hFc $\gamma$ R1IIa lo cual favorece una forma transmembranal (Lanier, et al 1989, Hibbs, et al 1989).

Las proteínas solubles de ambas isoformas han sido encontradas. La liberación de la isoforma hFc $\gamma$ R1IIb necesita una serina proteasa; en la liberación de la hFc $\gamma$ R1IIa intervienen metaloproteasas (Harrison, et al 1991).

Se reporta una isoforma para el Fc $\gamma$ R1II de ratón cuyo gen se localiza en el cromosoma 1, junto a la región codificante para el Fc $\gamma$ R1I de ratón (Qiu, et al 1990). Este receptor esta estructuralmente relacionado con el hFc $\gamma$ R1II, consta de 5 exones, dos exones para la región no traducida 5' y la secuencia líder, uno para cada dominio como de Ig y uno para la región transmembranal, citoplasmática y 3' no traducida. Se conserva hasta un 95 % de homología a nivel de secuencia de aa entre el mFc $\gamma$ R1II y el mFc $\gamma$ R1I (Ravetch, et al 1986).

Los Fc $\gamma$ R1II pertenecen al grupo de receptores de baja afinidad para las Ig. La isoforma hFc $\gamma$ R1IIb muestra una constante de afinidad menor a  $10^7 M^{-1}$  (Simmons and Seed, 1988) y la hFc $\gamma$ R1IIa tiene  $2 \times 10^7 M^{-1}$  (Vance, et al 1992). La especificidad para fijar los isotipos de IgG no ha sido completamente esclarecida aunque el hFc $\gamma$ R1IIb fija complejos inmunes de hIgG3 y hIgG1, pero no de hIgG2 o hIgG4 (Huizinga, et al 1989). La misma problemática se presenta para establecer la especificidad para fijar mIgG, aunque el hFc $\gamma$ R1IIa y hFc $\gamma$ R1IIb fijan mIgG2a, mIgG3 y en menor medida mIgG1 pero no mIgG2 (Braakman, et al 1993).

El mFcyRIII, al igual que su contraparte humana, fija ligandos con baja afinidad, y muestra una especificidad similar para fijar isotipos de IgG humana o de ratón, preferencialmente mIgG1, mIgG2a, mIgG2b, hIgG1 y hIgG3 (Lopez, et al 1985) y fija mIgE con baja afinidad (Takizawa, et al 1992).

#### CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DEL FcyRIII.

Características	Humano	Ratón
Peso molecular	30,000 a 60,000 daltones	40,000 a 60,000 daltones
Localización cromosómica	1q23-24	1
Clones	2 (A,II)	1
Proteína	Producto del gen A es transmembranal Producto del gen II se ancla a la membrana por un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI).	Transmembranal
Asociación con	Receptor transmembranal se asocia con homodímeros de cadenas $\gamma$ y heterodímeros $\gamma$ - $\epsilon$ .	Receptor transmembranal se asocia con homodímeros de cadenas $\gamma$ y heterodímeros $\gamma$ - $\epsilon$ .
Homología		95 % con el receptor FcyRIII de ratón.
Afinidad por el ligando (K <sub>d</sub> )	menor a $1 \times 10^{-6} M^1$	menor a $1 \times 10^{-6} M^1$
Especificidad por la IgG humana	IgG1, IgG3, en menor grado IgG2 e IgG4	IgG3, IgG1 y en menor grado IgG2 e IgG4
Especificidad por la IgG de ratón	IgG3, IgG2a, IgG2b	IgG1, IgG2a, IgG2b
Células que expresan el receptor		
Normales	Receptor transmembranal se localiza en macrófagos, células NK, células cebadas y células T. El receptor GPI-ancorado se encuentra en neutrófilos y eosinófilos.	Macrófagos, células NK y algunas células T.
Estimuladas con citocinas	Receptor transmembranal en monocitos. El receptor GPI-ancorado en neutrófilos.	Macrófagos.

Tabla 4. Características de la cadena  $\alpha$  del receptor FcyRIII (Datos tomados de Unkeles, et al 1988, Hartnell, et al 1992, Huizinga, et al 1989, Braakman, et al 1993, Lopez, et al 1985, Takizawa, et al 1992, Qui, et al 1990, Erbe, et al 1990, Kerst, et al 1993, van de Winkel and Capel, 1993, Ravetch, 1994)

La expresión de las isoformas de hFcyRIII parecen ser específicas para cada célula, (Tabla 4), así el hFcyRIIIb se expresa exclusivamente en neutrófilos, mientras que la forma transmembranal hFcyRIIIa se encuentra en macrófagos y células NK (Perussia and Ravetch, 1991), y en una pequeña población de monocitos (Passlick, et al 1989) y sobre algunas células T (Braakman, et al 1993). También el hFcyRIII se presenta en células mesenquiales del riñón y sobre los trofoblastos de la placenta (Sedmak, et al 1991). La expresión de este receptor es modulada positivamente por el TGF- $\beta$  en monocitos (Welch, et al 1990). La forma anclada a membrana por GPI, aunque sólo el IFN- $\gamma$  induce su expresión (Erbe, et al



1990); otros establecen que los neutrófilos tratados con IFN- $\gamma$ , GM-CSF y G-CSF cumplen con este papel (Buckle and Hoss, 1989). El TNF- $\alpha$  inhibe su expresión pero sin afectar la forma transmembranal (Mendel, et al 1988). Los eosinófilos también son inducidos para la expresión del receptor anclado por GPI en presencia de IFN- $\gamma$  (Hartnell, et al 1992). Su regulación negativa es modulada por la IL-4 como los otros dos tipos de receptores Fc (Te Velde, et al 1990).

El Fc $\gamma$ RIII esta en macrófagos, células NK, subpoblaciones de células T y células cebadas (Weinshank, et al 1988, Ravetch, 1994) y en timocitos fetales tempranos (Rodewald, et al 1993). La modulación positiva para el Fc $\gamma$ RIII de ratón, parece ser responsabilidad del IFN- $\gamma$  (Weinshank, et al 1988).

Los anticuerpos monoclonales 3G8, 4F7, VEPI3, 1D3, GRM-1, B73.1, CLB-GRANII, Leu11a y Leu11b, se unen al hFc $\gamma$ R III en el sitio de la fijación del ligando, en cambio el BW209/2 lo hace fuera (van de Winkel and Capel, 1993, Hulett and Hogarth, 1994).

El reconocimiento del Fc $\gamma$ RIII de ratón sólo se ha descrito con el anticuerpo monoclonal 2.4G2, el cual también reconoce al mFc $\gamma$ R II (Unkeless, 1979).

#### Señales celulares mediadas por los Fc $\gamma$ R.

La cadena  $\alpha$  de los Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIII en su forma transmembranal se encuentra asociada a otras moléculas con dominio transmembranal y citoplásmico, y se conocen como cadenas  $\gamma$  o  $\zeta$  (Ravetch, 1994). La cadena  $\alpha$  del hFc $\gamma$ RI se acopla a un complejo homodimérico de la cadena  $\gamma$ , en tanto que la cadena  $\alpha$  del hFc $\gamma$ RIII se une al complejo homodimérico, o heterodimérico, compuesto cada uno por cadenas  $\gamma$ ,  $\zeta$  o ambas respectivamente (Figura 5). Las cadenas  $\gamma$  y  $\zeta$  son cadenas descritas inicialmente como constituyentes del complejo del receptor de células T (TCR-CD3) (Orloff, et al 1990, Ohno, et al 1994). La ausencia de las cadenas  $\gamma$  o  $\zeta$  se refleja en una pérdida de la expresión de los TCR o de Fc $\gamma$ R, por tanto parecen ser esenciales para el ensamble del complejo y su expresión a nivel de membrana (Kurosaki and Ravetch, 1989, Klausner, 1989). La expresión en membrana del hFc $\gamma$ RI no requiere de la presencia de la cadena  $\gamma$ , pero si necesaria en la promoción de la fagocitosis (Indik, et al 1994)

Los homodímero, o heterodímeros, de  $\gamma$  y  $\zeta$  son necesarios para la transmisión de las señales intracelulares por los Fc $\gamma$ R y en las TCR. La cadena  $\alpha$  del Fc $\gamma$ RII y las cadena  $\gamma$ , o  $\zeta$ , tienen un segmento del tallo citoplasmático que se le denomina segmento de activación de receptores antígenicos, mejor conocidos como ARAM's (del inglés Antigen Receptor Activation Motifs) (Figura 5). Los ARAMs están constituidos por un residuo de tirosina (Y) seguido por otros 2 aa y Lisina (L) (YXXL) (Hulett and Hogarth, 1994, Cambier, et al 1994).

Después que los Fc $\gamma$ R fijan a su ligando (complejo Ag-Ab, o anticuerpos monoclonales contra los Fc $\gamma$ R, etc), se da la activación de los ARAMs probablemente cuando el dominio SH-2 de la tirosina es fosforilada (Sonyang, et al 1993) y con ello se inicia la transducción de señales que termina en la activación de tirosinas cinasas, elevación del calcio intracelular, liberación de mediadores inflamatorios, como leucotrienos, prostaglandinas, hidrolasas, y de radicales libres incluyendo la transcripción de genes de citocinas. Esta respuesta es similar a la observada cuando se activan los receptores de células T y B (TCR y BCR) (Paolini, et al 1995)

Los ARAM se asocian con moléculas inactivas de tirosina cinasa de la familia de la Src. El entrecruzamiento del dominio extracelular de los receptores activa a la cinasa y provoca la fosforilación de dos residuos de tirosina encontrados en los ARAM. El ARAM fosforilado interactúa con otras clases de tirosina cinasas, por ejemplo Syk y ZAP-70 a través de su asociación con SH2 (Weiss and Littman, 1994, Ravetch, 1994). Los complejos ARAM-Syk, o ZAP-70, fosforilan sustratos intracelulares como fosfolipasa C $\gamma$ 1 y fosfatidilinositol 3-cinasa (Iwashima, et al 1994).

La presencia de las regiones conservadas de los ARAM en cadenas  $\alpha$  del Fc $\gamma$ RII y cadenas  $\gamma$  y  $\zeta$ , no necesariamente indica que desencadenen respuestas generales y únicas; los ARAMs determinan el evento de señalización. La presencia de cadenas  $\gamma$  y como subunidad de TCR, o Fc $\gamma$ R, en las mismas células (una línea de células T), tienen distintas respuesta intracelular dependiendo del tipo del receptor activado (Paolini, et al 1995). Los TCR muestran distintas rutas de activación, la cual depende del tipo de cadena constituyentes del complejo ( $\gamma$  o  $\zeta$ ) (Ohno, et al 1993).

El hFcγRIIb, al estar anclado a la membrana por un enlace glicosil fosfatidil inositol (GPI), carece de un tallo transmembranal-citoplásmico y por tanto de ARAM, razón por la cual, a pesar de que el receptor fija su ligando, los neutrófilos no se activan (Wirthmueller, et al 1992). La activación de estas células ocurre por entrecruzamiento del FcγRIIa y el FcγRIIb, esto implica que el FcγRIIb activa a los neutrófilos por la vía del ARAM del FcγRIIa. La inhibición de la fijación de complejos inmunes a ambos receptores por anticuerpos contra cada uno de ellos, inhibe la activación de los neutrófilos (Huizinga, et al 1988, Selvaraj, et al 1988).

La señal de la transducción del hFcγRIIb que se expresa en linfocitos B representa una variación de la activación mediada por los ARAM (Amigorena, et al 1992, Muta, et al 1994). Este receptor se coexpresa con el receptor de las células B (BCR). La activación del linfocito B se da por por el entrecruzamiento de los BCR con las inmunoglobulinas (por su región fijadora del antígeno (Fab)), complejo BCR-IgG. La unión de este complejo por la parte Fc de la IgG al hFcγRIIb (complejo BCR-IgG-hFcγRIIb), provoca la fosforilación de un residuo de tirosina localizados en un segmento de 13 aa en el dominio citoplásmico del receptor Fc. Esta fosforilación bloquea el flujo de calcio al interior de la célula lo que propicia la desactivación celular. Una mutación del residuo de la tirosina inactiva el bloqueo provocado por el hFcγRIIb en los linfocitos B, lo que refuerza la hipótesis de que el la activación de este receptor regula negativamente la elicitación de estas células (Ravetch, 1994).

#### **Función de los FcR.**

Una de las principales funciones de los tres tipos de FcγR humano y de ratón, es su participación en la eliminación de agentes infecciosos cubiertos con anticuerpos. Los hFcγRI, II y III participan en la fagocitosis mediada por monocitos y macrófagos (Anderson, et al 1990, Huizinga, et al 1989) y en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, (ADCC) (Erbe, et al 1990, Fanger, et al 1989a). De hecho la ADCC fue una de las primeras actividades funcionales relevantes descritas para los FcγR, ya que por este mecanismo se da la eliminación de células tumorales (Moller, 1965). La ADCC tiene lugar

cuando una célula que expresa receptores Fc entra en contacto con una célula blanco cubierta con anticuerpo, así se forma un conjugado que se elimina, y la célula blanco es letalmente dañada, mientras que la efectora está lista para ponerse en contacto con una nueva célula blanco (Segal, 1990). El desarrollo de anticuerpos biespecíficos (anticuerpos que por un extremo reconoce y se unen a los Fc $\gamma$ R mientras que por el otro, reconoce a otro antígeno), ha facilitado el contacto entre una célula efectora con una célula blanco de interés (Segal and Snider, 1989, Segal and Wunderlich, 1988), así se favorece la lisis celular que bajo condiciones normales no se daría nunca. Lo relevante de este tipo de anticuerpos es que puede convertir en blanco a cualquier tipo de célula. Por ejemplo, esta tecnología se está desarrollando para eliminar células leucémicas (Wallace, et al 1994). No se conoce en forma exacta el mecanismo de lisis pero se considera que la célula efectora libera potentes proteínas citotóxicas formadoras de poros mejor conocidas como citolisinas o perforinas (Henkart, 1985). Los hibridomas productores de anticuerpos anti-Fc $\gamma$ R que expresan en su membrana este tipo de moléculas, al entrar en contacto con monocitos o neutrófilos sufren lisis celular (Erbe, et al 1990). Esta propiedad ha sido usada para determinar no sólo la participación de cada tipo de Fc $\gamma$ R en la ADCC, sino también para identificar a aquellas citocinas que modulan la expresión de estos receptores (Erbe, et al 1990). El uso de anticuerpos ha facilitado la identificación del grupo de moléculas que activan la ADCC, la lista se restringe a los Fc $\gamma$ R, y los receptores como TCR, CD3 y CD2 en las células T (Segal and Snider, 1989, Segal and Wunderlich, 1988).

La unión del ligando a los Fc $\gamma$ R desencadena actividades biológicas. Por el entrecruzamiento de los Fc $\gamma$ RI se desencadena la producción de radicales libres derivados del O<sub>2</sub> (Anderson, et al 1986, Pfefferkorn and Fanger, 1989), liberación de IL-6 (Krutmann, et al 1990), y junto con el Fc $\gamma$ RII también inducen la liberación de TNF- $\alpha$  (Debets, et al 1990). Además se ha reportado que durante la fagocitosis, mediado por el Fc $\gamma$ RI, de eritrocitos sensibilizados con IgG, hay liberación de IL-1 (Simms, et al 1991). Por su parte, la activación del Fc $\gamma$ RII dispara el estallido respiratorio de neutrófilos (Crockett-Torabi and Fantone, 1990).

La activación del Fc $\gamma$ RIII en macrófagos y monocitos generan radicales libres (Trezzi, et al 1990, Welch, et al 1990), y su activación induce la apoptosis en células NK (Azzoni, et al 1995). Se sugiere que el Fc $\gamma$ RIIIb en neutrófilos se asocia con el Fc $\gamma$ RIIa y de esta forma participa en la degranulación de neutrófilos y fagocitosis (Boros, et al 1991).

El Fc $\gamma$ RIII parece ser fundamental en la diferenciación de las células NK. Los timocitos fetales que expresan el Fc $\gamma$ RIII, si salen del timo, conservan el receptor y se convierten en las células NK, si permanecen en este órgano, pierden el receptor y se convierten en células T CD4, o CD8 (Rodewald, et al 1993).

Los Fc $\gamma$ R de ratón participan en la fagocitosis, ADCC y liberación de agentes citotóxicos e inflamatorios (Mellman, et al 1983, Mellman, et al 1988), aunque sólo recientemente se tipificó que el mFc $\gamma$ RII y mFc $\gamma$ RIII participan en la degranulación de células cebadas así como en la endocitosis y fagocitosis (Daeron, et al 1980, 1994)

El Fc $\gamma$ RIIIb de ratón y humano es el único receptor que al fijar la fracción Fc de las IgG desencadena una señal negativa dominante que inhibe la proliferación de las células B y la producción de inmunoglobulinas (Phillips and Parker, 1983, Sarmay, et al 1991).

En los últimos años, se dieron evidencias de la participación de los Fc $\gamma$ R y complejos inmunes de IgG en la hipersensibilidad tipo I, una actividad sólo atribuida a complejos inmunes de IgE y a su receptor, el Fc $\epsilon$ R, teniendo a las células cebadas como las efectoras (Oettgen, et al 1994). En esta misma línea, se ha reportado que en pacientes con enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico (LES) o artritis reumatoide (AR) se caracterizan por presentar complejos inmunes de IgG, la inflamación en estos pacientes se le denomina hipersensibilidad o inflamación tipo III. La aparición de la inflamación tipo III requiere de la presencia de complejos inmunes de IgG, complemento y neutrófilos, la disminución de cualquiera de los tres agentes atenúa la respuesta inflamatoria (Gallin, 1993). Se ha observado en experimentos *in vitro* que los componentes del sistema del complemento se unen directamente al complejo inmune de IgG. Esta unión provoca la activación de la cascada del complemento (Perlmutter and Colten, 1984). Ravetch y su grupo, usando ratones deficientes en la expresión de Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIII, por mutación del gen

para la cadena y, encontraron que en estos ratones no se desencadena la reacción de Arthus, un ensayo clásico para activar la respuesta inflamatoria tipo III. En estos ratones, a pesar de contar con un sistema de complemento intacto, no se presentó la acumulación de neutrófilos. En base a estos datos, planteó un modelo de tres pasos para explicar este tipo de reacción en donde los Fc $\gamma$ R juegan un papel fundamental. En la fase inicial se requiere de la presencia de antígenos y moléculas de IgG para formar los complejos inmunes de IgG. Propone que las células cebadas participan en esta fase fijando los complejos inmunes de IgG vía su receptor Fc, concretamente del tipo Fc $\gamma$ RIII. El entrecruzamiento de este receptor activa a las células cebadas, las cuales por un mecanismo no conocido, favorecen la activación de la cascada de complemento. En la segunda fase (reclutamiento) se acumulan los neutrófilos en el sitio de la inflamación por el efecto quimiotáctico que tiene algunos derivados del complemento. En la fase de activación los neutrófilos eliminan los complejos inmunes de IgG, liberan aminas vasoactivas responsables de la formación del edema, por otro lado también liberan enzimas lisosomales las cuales destruyen el tejido inflamatorio provocando necrosis hemorrágica (Ravetch, 1994).

Se sugiere que las células cebadas participan en la fase de activación de la respuesta inflamatoria en este modelo, sin embargo, es de llamar la atención que algunos linfocitos T de pacientes con AR, también expresan elevadas cantidades de Fc $\gamma$ RIII (Lamour, et al 1995), por lo que sería interesante evaluar si estas células intervienen en la fase inicial de la respuesta inflamatoria.

## ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION.

Las células sanguíneas maduras se generan por la hematopoyesis, evento en el que participan células precursoras y citocinas. Las citocinas son las responsables de regular la proliferación y diferenciación de las células precursoras. Así durante la diferenciación las células precursoras van adquiriendo características morfológicas y funcionales como consecuencia de la expresión o pérdida de una multitud de moléculas en la superficie celular. Con respecto a las células mieloides, existen datos que indican que los Fc $\gamma$ R y antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad-I (MHC-I) son los primeros marcadores expresados en la superficie celular (Fibach, et al 1973, Ruhl and Pluznik, 1993). Posteriormente las células adquieren la capacidad de secretar enzimas lisosomales como la lisozima (Krystosek and Sachs, 1976, Sachs, 1978) y adquieren una capacidad fagocítica. (Ichikawa, 1969, Ruhl and Pluznik, 1993). La expresión de Fc $\gamma$ R, la producción de lisozima, la actividad fagocítica y los cambios morfológicos son los parámetros más utilizados como indicadores de diferenciación de las células mieloides (Fibach, et al 1973, Sachs, 1978, Kerst, et al 1993, Ruhl and Pluznik, 1993, Michishita, et al 1990). Se ha establecido que durante la diferenciación de las células del linaje granulocito-neutrófilo se observa una expresión diferencial de los tres tipos de Fc $\gamma$ R hasta ahora caracterizados. En el estado de promielocito hasta metamielocito se expresan exclusivamente receptores Fc $\gamma$ RI, mientras que los granulocitos en banda hasta polimorfonucleares expresan principalmente el Fc $\gamma$ RII y el Fc $\gamma$ RIII (Kerst, et al 1993).

No obstante del avance del conocimiento en el campo de los receptores Fc y de su innegable importancia biológica que tienen en el contexto, hay poca información acerca de las citocinas que participan en la regulación de la expresión en células humanas y en ratón

Las citocinas reportadas como inductores a la expresión de receptores Fc en granulocito-neutrófilos, monocito macrófagos y líneas leucémicas como U-937 y HL-60 humanos se indican en la tabla 5 (Liesvel, et al 1988, Buckle and Hogg, 1989, Repp, et al 1991, Kerst, et al 1993), sin embargo existen datos contradictorios de esta participación, incluso se ha señalado que el único factor inductor de Fc $\gamma$ R es el IFN- $\gamma$  (Erbe, et al 1990). Este tipo de

estudios es más escaso en las células del ratón. Se requieren más estudios para confirmar la participación de los factores de crecimiento hematopoyético en la inducción de los Fc $\gamma$ R .

#### CITOCINAS INDUCTORAS DE RECEPTORES Fc EN CELULAS DE RATON Y HUMANO

	Fc $\gamma$ R I		Fc $\gamma$ R II		Fc $\gamma$ R III		
	Ratón	Humano	Ratón	Humano	Ratón	Humano	
Regulador+	IFN $\gamma$	IFN $\gamma$ IL-10 IL-6 G-CSF	IL-6		IFN $\gamma$	Fc $\gamma$ R III $\alpha$ TGF $\beta$	IFN $\gamma$ GM-CSF G-CSF
Regulador-		IL-4		IL-4		IL-4	TNF

Tabla 5 Citocinas que regulan positiva y negativamente la expresión de los diferentes tipos de Fc $\gamma$ R tanto en ratón como en humanos (Erbe, et al 1990, Kerst, et al 1993, Uckelies, et al 1988, Ravetch, 1994).

En el Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer, de la Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM, una de las líneas de investigación es la identificación de los factores que modulan positivamente la expresión de los receptores Fc y para receptores de complemento (C3b) y se ha reportado la existencia de un factor inductor de receptores Fc al cual se le denominó FcRI (Fc Receptor Inducer) (Calcagno, et al 1982, Frago, et al 1985) y de un factor inductor de receptores para la fracción del complemento 3 (C<sub>3</sub>RI: C3 Receptor Inducer) (Calcagno, et al 1983, Frago, et al 1985). El FcRI tiene un peso molecular de aproximadamente 17,000 daltones, un punto isoeléctrico de 7.2 y es producido por células macrofágicas, interesantemente, estas características que son compartidas por la IL-1 $\beta$ .

La participación de la IL-1 en la inducción de receptores Fc en células de ratón ha sido poco analizada, a diferencia del IFN- $\gamma$  e IL-6 (Chiu and Lee, 1989, Ruhl and Pluznik, 1993). Los estudios en líneas mieloides de ratón, como M1, señalan que tanto la IL-1 $\alpha$  como la IL-1 $\beta$  sinergizan la expresión de este tipo de receptores promovidos por el LPS (Onozaki, et al 1987, 1988), incluso inhibe la proliferación de estas y otras células en las que se incluye la línea mieloides humana (K562), razón por la cual se le llegó a considerar un agente



antineoplásico (Onozaki, et al 1985, 1987, Lovett, et al 1986). Sin embargo, otros estudios con células humanas establecen que no tiene ningún efecto (Erbe, et al 1990) y hay evidencias de que la IL-1 tiene un papel inhibitor de la inducción a la expresión de FcγR promovido por el IFN-γ (Arend, et al 1987). Sin embargo en ese trabajo aunque se dan evidencias de que la IL-1 es un inhibidor de la expresión de FcγR, resulta paradójico que en una de sus tablas se observa que la adición de IL-1 a monocitos de sangre periférica y en una línea leucémica macrófagica humana, la THP1, existe un fuerte incremento en los niveles de su expresión. Considerando estos datos y sumados a los de nuestro laboratorio, se considera que la IL-1 está involucrada en la inducción de receptores Fc. Este trabajo se desarrolló con la finalidad de contribuir al esclarecimiento de la participación de la IL-1 en la inducción a la expresión de los FcγR, producción de lisozima y fagocitosis en las células mieloides normales y leucémicas de ratón y humano. Estudio que permitirá contribuir al conocimiento de la biología básica de la inducción de los receptores Fc y producción de lisozima en las células mieloides. La información generada ayudará a plantear nuevos enfoques para evaluar su uso clínico, ya sea para una modulación positiva o negativa de la inducción de los receptores Fc, tanto para el diseño de medidas profilácticas, así como en algunos casos de patología humana.

## METODOLOGÍA.

Material biológico. En este trabajo se emplearon ratones de ambos sexos de la cepa CD-1 de 6 a 8 semanas de edad, como fuente para la obtención de células de médula ósea, linfocitos de timo, bazo, macrófagos y granulocito-neutrófilos de cavidad peritoneal. También se usó sangre periférica humana de donadores sanos para la obtención de monocitos y linfocitos.

### Obtención de células.

Células de médula ósea. Las células de médula ósea se extrajeron de los ratones haciendo fluir una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) de un extremo a otro de cada fémur. Las células eluidas se colectan en un tubo para centrifuga, se resuspenden en PBS y se lavan por centrifugación a 500 g durante 3 min, proceso que se repite 3 veces. Posteriormente el botón celular se resuspende en medio de cultivo ( Medio Mínimo Esencial de Eagle; MEM), se toma una muestra y se deposita en un hemocitómetro para evaluar la cantidad de células.

Granulocito-neutrófilos. Los granulocito-neutrófilos son colectados de la cavidad peritoneal del ratón después de 16 h de la inyección intraperitoneal de 3 mL de caseinato de sodio al 10 % en PBS estéril. Las células se obtienen por lavado de la cavidad peritoneal mediante la inyección y succión de 10 mL de PBS, operación que se repite 2 veces más con 5 mL de PBS. El exudado peritoneal es depositado en tubos cónicos de plástico y almacenados en hielo. Las células del exudado se lavan con PBS y se centrifugan como se señala en el párrafo anterior. Una mayor purificación de los granulocito-neutrófilos se consigue incubando  $8 \times 10^6$  células en cajas de petri de vidrio de 15x60 mm durante 1 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se colecta el sobrenadante en donde se encuentran suspendidos los granulocito-neutrófilos, se lavan por centrifugación en PBS, se resuspenden en MEM y se cuantifica el número celular. En estas condiciones se obtiene más del 95 % de granulocito-neutrófilos.

Macrófagos residentes (Mac R). Después de sacrificar al ratón se procede a lavar la cavidad peritoneal. Para enriquecer la población de Mac R, las células, después de ser lavadas, se siembran a una densidad de  $8 \times 10^5$ , o  $4 \times 10^5$  células por cajas de petri de 15x60 mm, o por cada pozo en placas de 96 pozos respectivamente. Después de 1 h de incubación a 37 °C se retira el sobrenadante y se agrega MEM fresco. Las cajas de cultivo

con macrófagos son teñidas con Giemsa para evaluar la pureza de la población. Bajo estas condiciones más del 95 % de las células son macrófagos.

**Macrófagos inducidos (Mac I).** La obtención de este tipo de células se realiza como en la obtención de Mac R, excepto que los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 3 mL de caseinato de sodio al 10 % 4 días antes del sacrificio (Monroy, 1983). La obtención y purificación se realiza como en Mac R. Con este proceso más del 95 % son macrófagos.

**Linfocitos de ratón.** El timo y el bazo son la fuente de linfocitos. Ambos órganos son depositados en cajas de petri con MEM y seccionados en fragmentos de aproximadamente 2 mm<sup>2</sup>, éstos son presionados con pinzas estériles para favorecer la liberación de las células. Finalmente las células cosechadas se lavan y la población es enriquecida en forma similar a la de los granulocitos. En estas condiciones se obtiene hasta un 98 % de linfocitos.

**Monocitos y linfocitos de sangre periférica humana.** Con una jeringa de 20 mL, conteniendo 0.1 mL de heparina (1000 U/mL) (Rickercab/NCB, USA), se colectan de 10 a 20 mL de sangre periférica de donadores sanos. La sangre es centrifugada por 10 min a 500 g, se colecta el plasma mientras que el paquete celular es diluido al doble con MEM y nuevamente centrifugado por 10 min, se tira el sobrenadante y el paquete celular se resuspende en MEM fresco. Cinco mL del homogenado celular es depositado lentamente en tubos cónicos que contienen 2 mL de Ficoll Hypaque (1.077 g/mL), se centrifugan por 30 min a 300 g. Después de la separación celular, las células blancas (mononucleares) ubicadas en la interfase MEM-Ficoll son colectados cuidadosamente con una pipeta. Las células mononucleadas colectadas son depositadas y resuspendidas en tubos cónicos limpios y estériles conteniendo MEM fresco, se lavan por centrifugación como en el caso de las células de ratón.

Las células mononucleadas libres de ficoll son incubadas por 1 h a 37 °C en cajas de petri previamente tratados durante 15 min con suero del mismo donador, posteriormente se colecta el sobrenadante y con ello a los linfocitos. Las células adheridas constituyen la población de monocitos y son desprendidas del sustrato de cultivo con una solución de verseno (20.5 g de dextrosa, 8 g de citrato de sodio dihidratado, 0.55 g de ácido cítrico monohidratado y 4.2 g de cloruro de sodio por litro de agua/ pH 6.1). Después que los monocitos han sido desprendidos, se lavan con MEM por centrifugación y finalmente se cuentan en un hemocitómetro. La pureza de la población de monocitos es de más del 90 %

Los linfocitos suspendidos en el sobrenadante son lavados con MEM fresco por centrifugación y finalmente se evalúa el número celular. Su pureza es de más del 95 %.

Células leucémicas. WR19M.1, una línea leucémica de tipo macrofágico de ratón fue gentilmente donada por el Dr. Jay C. Unkeless, Mount Sinai School of Medicine, New York. WEHI3Bd-, una línea leucémica de tipo promielocítica de ratón fue donada por el Dr. Michael Dexter, Paterson Institute, Manchester, Inglaterra. También se emplea la línea leucémica monocítica humana U-937, amablemente donada por el Dr. José Sullivan, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, D.F., México, la cual fue adquirida del ATCC. Cabe señalar que este tipo de células fueron sembradas cada cuatro días en MEM y 10% de suero de bovino fetal (FBS) (Hyclone Labs., Logan, Utah, USA) y una densidad de  $5 \times 10^4$  células por caja de cultivo de 15x60mm.

Cultivo celular. Las células mieloides de ratón fueron cultivadas en una atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub>, 37 °C y humedad al 100 %, con MEM suplementado con 10 % de suero de caballo (SC) (Micolab, D.F., México) (Lotem and Sachs, 1988). Los linfocitos y las células leucémicas de ratón, así como las células de humano fueron suplementados con 10 % de FBS. Ambos sueros previamente inactivado a 56°C por 30 min. El MEM también fue suplementado con estreptomycin (100 µg/mL), penicilina G (100 U/mL), y bicarbonato de sodio (3.7 mg/mL). Todos los cultivos fueron hechos usando cajas de cultivo, ya sea de 15x60 mm, o 10x30 mm, o en placas de 24, o 96, pozos (Costar, Cambridge, MA.) conteniendo un volumen final de 5, 2.5, 0.7 y 0.2 mL de medio de cultivo respectivamente. En estos volúmenes se incluyen las concentraciones de las diferentes citocinas e inductores naturales empleados como estimuladores.

Inductores de FcγR. Como una fuente del inductor de receptores Fc (FcRI) se empleó el medio condicionado de macrófagos residentes (MCMac R) e inducidos (MCMac I) de cavidad peritoneal de ratón. Entre las citocinas recombinantes humanas tenemos al G-CSF, M-CSF, IL-1α, IL-1β (todas muestra actividad sobre las células de ratón), e IFN-γ (es activa sólo en células humanas) (Immunex, Corporation, Seattle, WA). IFN-γ recombinante de ratón (solo activa en células de ratón) y rhTNFα (carece de actividad especie específica) (Genzyme, Cambridge, MA). Se emplearon anticuerpos policlonales de conejo y cabra anti-IL-1β humano (Immunex, Corporation, Seattle, WA y de R&D System, Minneapolis, MN respectivamente).

Fuente del FcRI. Los Mac R y Mac I fueron sembrados a una densidad de  $8 \times 10^6$  células por caja de petri de 15x60 mm en MEM con 1 ng/mL de lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella typhosa* (Difco Labs., Detroit, Mich.). Después de 4 días de incubación, se colecta el sobrenadante, se centrifuga y se almacena a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso. Al sobrenadante se denomina MCMac R si proviene de un cultivo de macrófagos residentes, o MCMac I, si proviene de macrófagos inducidos. Ambos medios condicionados fueron usados como fuente del inductor de receptores Fc; el FcRI.

Cuantificación de la inducción de Fc $\gamma$ R por la IL-1. Para la evaluación de la expresión de receptores Fc se empleó la técnica de rosetas. Esta técnica se fundamenta en la capacidad de los Fc $\gamma$ R para fijar complejos antígeno-anticuerpo (Bianco, et al 1970). Tradicionalmente se han empleado eritrocitos de carnero recubiertos con anticuerpo anti-eritrocito de carnero como complejo antígeno-anticuerpo, también conocido como eritrocitos sensibilizados (EA). La incubación de los EA con las células mieloides, o linfoides, que expresan Fc $\gamma$ R, forman un complejo célula-eritrocito, al cual se le conoce como rosetas EA. La inspección al microscopio de las células permite señalarlas como rosetas positivas cuando tienen adheridos 3 o más EA.

Preparación de EA. En la preparación de eritrocitos cubiertos con anticuerpo se utilizó IgG (7S) policlonal de conejo contra eritrocitos de carnero (Cordis Labs, Mich.) diluida 1:1600 con PBS, concentración de anticuerpo que no aglutina a los eritrocitos. Las células rojas de carnero son lavadas por centrifugación con PBS, y se incuban con los anticuerpos por 30 min a  $37^\circ\text{C}$ , se lavan con PBS para eliminar el exceso de los anticuerpos policlonales.

Formación y cuantificación del número de rosetas. Las células tratadas a diferentes tiempos con, o sin inductores, para inducir la expresión de Fc $\gamma$ R, fueron cosechadas y resuspendidas en MEM fresco, las células así obtenidas se mezclaron con EA en una relación de aproximadamente 100 eritrocitos por leucocito, se centrifugaron para formar un botón celular y así se incubaron por 30 min a  $37^\circ\text{C}$ . Transcurrido este tiempo, el botón celular fue resuspendido lentamente a homogeneidad. De esta solución se tomó una muestra y se depositó en un hemocitómetro, se observó y cuantificó la formación de rosetas bajo un microscopio. Cada evaluación se realizó contando mínimamente 200 leucocitos por muestra.

Evaluación de la producción de lisozima en macrófagos elicitada por la IL-1. El sobrenadante de los cultivos de las células estimuladas para inducir la expresión de Fc $\gamma$ R fueron colectados en tubos de ensaye. Una décima de mL del sobrenadante se puso en contacto con 2.5 mL de una solución de *Micrococcus lysodeikticus*. Al min 1 después de iniciada la reacción se evaluó la absorbancia en un espectrofotómetro a 450 nm. Si el sobrenadante contiene lisozima se observa un decremento en la absorbancia de la solución. La cantidad de lisozima se obtuvo de la comparación con los datos obtenidos de una curva patrón en donde se utilizaron diferentes concentraciones (de 2 a 20  $\mu$ g/mL) de una solución patrón de lisozima de albúmina de huevo de gallina (Merck, Germany). Una unidad de actividad de lisozima se considera equivalente a la cantidad requerida para un cambio de 0.001 en la absorbancia a 450 nm (Nerurkar, 1981).

Ensayo de fagocitosis estimulada por la IL-1. Los macrófagos fueron incubados a 37 °C por 1 h con 10  $\mu$ L/mL de una suspensión que contiene esferas de látex LB-11 de 1.09  $\mu$ m. de diámetro. Los macrófagos fueron teñidos con May-Greenwald-Giemsa para su evaluación. Fueron consideradas células positivas cuando fagocitan más de 5 esferas de látex. Para evaluar la inmunofagocitosis, los macrófagos con rosetas EA fueron incubados por 30 min a 37 °C, después son lavados y teñidos. Fueron consideradas células inmunofagocíticas cuando al menos 3 eritrocitos fueron fagocitados. Al menos 200 células fueron evaluadas para cada determinación.

Inducción a la formación de colonias. Para la estimulación a la formación de colonias se usó la técnica de cultivo de doble capa en agar (Pluznick and Sachs, 1965). Brevemente, en cajas de petri de 15x60 mm se coloca una primera capa de agar al 0.6 % y medio de cultivo en presencia o ausencia de citocinas, y sobrepuesta una segunda capa con 0.3% de agar la cual contiene aproximadamente  $5 \times 10^5$  células mononucleadas de médula ósea en un volumen total de 2 mL. Después de 7 días de incubación y con la ayuda de microscopio, los grupos de más de 30 células fueron registrados como colonias.

Morfología de las células y de las colonias. La evaluación de la morfología de las colonias fue realizada por modificación de la técnica de transferencia de colonias sobre un cubreobjetos (Moezzil, 1986). Brevemente, sobre la capa de agar cortada en aproximadamente un rectángulo de 2.5 x 1 cm, se cubre con un papel filtro Whatman Núm. 2 (Whatman Incorporated, Clifton, NJ) de las mismas dimensiones, y una vez húmedo se retira lentamente para arrastre el agar, se deposita sobre un cubreobjetos, se deja secar a temperatura ambiente por 45 min. Finalmente se retira el papel filtro, en esta

ocasión evitando llevarse el agar. Las colonias depositadas sobre el cubreobjetos son fijadas con metanol y teñidas con May-Greenwald-Giemsa. Cuando las colonias contienen células con núcleo en forma de anillo o ségmentados fueron registradas como granulocíticas. Si las células eran grandes y vacuoladas se registraron como colonias macrofágicas.

Para detectar la presencia de IL-1 en el MCMac R (fuente de FcRI) se realizó una inmunoelectrotransferencia, e inmunoprecipitación (Coligans, et al 1992). Electroforesis. Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS con un gel concentrador de 4.5. Las concentraciones finales en el gel separador fue de 0.375 M Tris-HCl (pH 8.9 y 0.1 % p/v de SDS, y las concentraciones de acrilamida usadas son 7.5 % o 12.5 % p/v). Los geles fueron polimerizados por la adición 0.05 % p/v de persulfato de amonio, tetrametilileno-diamina (TEMED) (gel de resolución), o 0.1% de cada catalizador en el gel concentrador. La solución del tanque (pH 8.3) contiene 0.025 M de Tris, 0.192 M de glicina y 0.1% de SDS. Las muestras fueron disociadas en ebullición por 5 min en una solución que contiene 100 mM de Tris-HCl pH 6.8, 1% de SDS, 10% de glicerol, 50 mM de DTT y 0.01% de azul de bromofenol. La electroforesis se realizó con voltaje constante de 100 V por 2 h. Los marcadores preteñidos fueron los siguientes: fosforilasa B (97,400 daltones), albúmina (66,200 daltones), ovalalbúmina (45,000 daltones), anhidrasa carbónica (31,000 daltones), inhibidor de tripsina (21,500 daltones) y lisozima (14,400 daltones) (Bio-Rad Laboratories, Inc, California, USA). Inmunoelectrotransferencia (Western Blot). Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa en un aparato de transferencia semiseca, a corriente constante de 100 mA durante 2 horas. El buffer de transferencia contiene 25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% (v/v) metanol y 0.05% SDS, pH 8.3. La eficiencia de la transferencia fue determinada mediante tinción de la membrana de nitrocelulosa con rojo de Ponceau S y destañada con agua destilada. La nitrocelulosa que contiene las proteínas inmovilizadas fueron bloqueadas con 5% (p/v) de leche semi-descremada en polvo en buffer TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.5) durante toda la noche a 4 °C. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos anti-IL-1 $\beta$  en TBS-5% leche durante 2 horas a temperatura ambiente. La membrana fue lavada cinco veces con TBS durante 10 min cada lavada y una vez con TBS-5% leche. Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (IgG-AP de carnero contra IgG de conejo, Boehringer, Mannheim, Germany) diluida en TBS-5% de leche, incubandolo durante 2 horas a temperatura ambiente. El filtro fue lavado 5 veces como se indicó anteriormente. Después de lavar, la membrana se reveló en 5 mL de buffer de fosfatasa alcalina (100 mM Tris pH

9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) que contenía 0.82 mg de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-Fosfato y 1.65 mg de azul de tetrazolio. La reacción se detuvo después de 15 min mediante lavado con agua destilada.

**Inmunoprecipitación.** Se incubó proteína G-sefarosa con anticuerpo de cabra anti-rhIL-1 $\beta$  por 4 h a 4°C, se agregó 40  $\mu$ L de MCMac R, MC de HL-60 (línea de célula promielocítica humana que no produce IL-1 $\beta$ ), INBL, células de carcinoma cervicovaginal (todos concentrados 30 veces) y rhIL-1 $\beta$  (130 ng). 12 h después de una incubación a 4°C, se lavó con una solución tampón (buffer) de lavado y se desprendió el inmunoprecipitado, con buffer de citratos (40  $\mu$ l), se disociaron las moléculas en ebullición por 2 min, se mezclaron con buffer de corrida y cada muestra se cargó en un carril en el gel SDS-PAGE. Las proteínas se revelaron con un tinción de plata no amoniacal.

**Varios.** Todos los experimentos fueron realizados por duplicado y los resultados son expresados como la media y su desviación estándar. Todos los productos bioquímicos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co., St Louis Mo., a menos que se indique otra procedencia.

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) y sujetos a la prueba de Bonferroni con una P=0.001, usando el software Statgraphics Versión 5.0.



## RESULTADOS

**La interleucina-1 $\beta$  recombinante humana (rhIL-1 $\beta$ ) induce la expresión de receptores Fc en células macrófágicas de ratón.**

Al inicio de la década de los 80's se caracterizó un factor inductor de la expresión de Fc $\gamma$ R sobre células de médula ósea de ratón, al cual se le denominó FcRI (Fc Receptor Inducer) (Calcagno, et al 1982, Fragoso, et al 1985). Este factor es producido por macrófagos y tiene un pI de 7.2 y PM de 17 000 daltones, características que son compartidas por la IL-1 $\beta$ , por lo que existía la posibilidad de que el FcRI e IL-1 $\beta$  fueran la misma molécula, por tanto que la IL-1 fuera un inductor de Fc $\gamma$ R en este grupo de células. Con la finalidad de evaluar esta hipótesis se cultivaron  $5 \times 10^5$  células de médula ósea por 4 días en presencia de 12 ng/mL de rhIL-1 $\beta$ . Se empleó esta concentración porque es la dosis recomendada para inducir efectos biológicos en el sistema hematopoyético (proliferación de linfocitos) (Tocci, et al 1987). Se utilizó como control positivo 100  $\mu$ L/mL del medio condicionado de macrófagos residentes (MCMac R) porque tiene una fuerte actividad de FcRI (Fragoso, et al 1985), también se utilizó un factor recombinante no asociado con la diferenciación de fagocitos como la rhIL-2 (1000 U/mL) y un cultivo sin inductor en calidad de controles negativos. Los resultados indican que la rhIL-1 $\beta$  indujo significativamente ( $P= 0.001$ ) la expresión de Fc $\gamma$ R en células de médula ósea en relación a los controles, pero fue significativamente menor que el nivel de expresión inducida por el FcRI (Figura 6).

Después de determinar que la rhIL-1 $\beta$ , al igual que el FcRI, induce la expresión de Fc $\gamma$ R en las células de la médula ósea, era indispensable identificar al linaje celular blanco de estos factores. Se consideró que las células blanco podrían ser los macrófagos y los granulocito-neutrófilos porque son las principales células mieloides que se encuentran en la médula ósea y que expresan Fc $\gamma$ R. Para evaluar esta posibilidad se inició el estudio con macrófagos de ratón, por lo que se procedió a cultivar por 2 y 4 días  $4 \times 10^5$  células de macrófagos residentes (Mac R) e inducidos (Mac I) de la cavidad peritoneal de ratón, en presencia de 12 ng/mL de rhIL-1 $\beta$ , como controles positivos se usaron 100  $\mu$ L/mL de MCMac R y de macrófagos inducidos (MCMac I), también fuente de FcRI y un control

LA IL-1 INDUCE LA EXPRESION DE RECEPTORES Fc EN CELULAS DE MEDULA OSEA DE RATON.

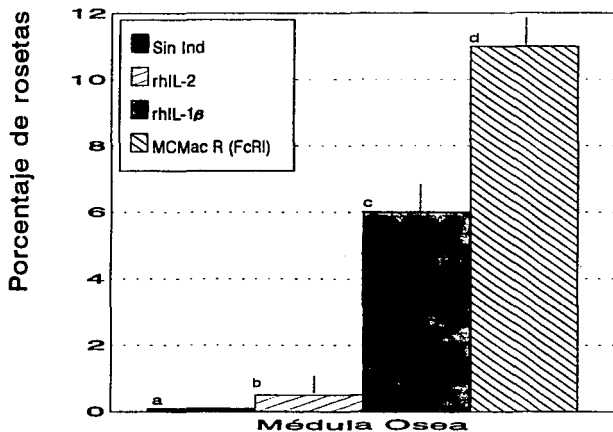


Figura 6. Porcentaje de células de médula ósea de ratón con receptores Fc cultivadas durante 4 días Sin Inductores (Sin Ind), Medio Condicionado de Macrófagos Residentes (MCMacR) como fuente del Factor Inductor de Receptores Fc (FcRI), Interleucina-1 beta recombinante humana (rhIL-1β) e Interleucina-2 recombinante humana (rhIL-2). Entre a y b no hay diferencia significativa, pero si entre b con c y d, así como entre c y d (P=0.001).

negativo sin inductor. Los resultados indican que después de 2 días de cultivo la rhlL-1 $\beta$  indujo significativamente ( $P=0.001$ ) la expresión de receptores para Fc ya que se incrementó este tipo de receptor en la población de Mac R hasta un 39 %, casi el doble de lo observado en el control negativo y mayor que el obtenido por estímulo con los MCMac R y MCMac 1 (33 y 31% respectivamente, aunque estadísticamente la diferencia no es significativa) (Figura 7). La rhlL-1 $\beta$  ejerce el mismo efecto en los macrófagos inducidos (Figura 7), una población macrofágica que se considera menos madura que los Mac R (Meltzer, 1981). A los 4 días de cultivo existe un comportamiento similar, sin embargo el testigo sin inductor mostró un mayor porcentaje de células con receptores comparado con el de 2 días (como se observa en la Figura 10). La rhlL-1 $\beta$  induce la expresión de Fc $\gamma$ R en macrófagos después de 2 días de cultivo.

Con la finalidad de evaluar la capacidad de inducción de la expresión de receptores Fc en Mac R por otros factores recombinantes, asociados con la diferenciación de células fagocíticas, procedimos a cultivar  $4 \times 10^5$  Mac R durante 2 días en presencia de rhlL-1 $\beta$ , así como de rhM-CSF (10 ng/mL) y de rhG-CSF (200 ng/mL). Se utilizó en este experimento un factor recombinante no asociado con la diferenciación de fagocitos como la rhlL-2 (1000 U/mL) y un cultivo sin inductor en calidad de controles negativos. Cabe señalar que también se adicionó 10 ng/mL de LPS, porque se ha reportado que es un activador de macrófagos (Sachs, 1987a).

Los resultados muestran que la rhlL-1 $\beta$  fue el único factor que indujo una fuerte expresión de receptores Fc en Mac R. Del 16 % en el cultivo sin inductor a un 40 % (diferencia significativa entre los valores con una  $P=0.001$ ), el rhM-CSF por su parte tuvo un pequeño, pero estadísticamente significativo ( $P=0.001$ ), efecto inductor, en tanto que el rhG-CSF y la rhlL-2 no muestran ninguna diferencia significativa con respecto al cultivo sin inductor (Figura 8). El LPS en este y en otros ensayos no mostró actividad inductora a la expresión de Fc $\gamma$ R (Figura 8)

## LA IL-1 INDUCE LA EXPRESION DE RECEPTORES Fc EN CELULAS MACROFAGICAS.

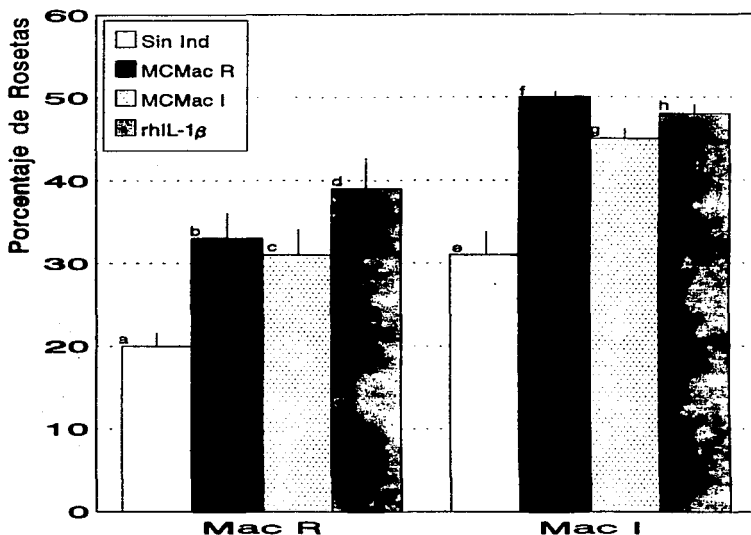


Figura 7. Porcentaje de células con receptores Fc después de dos días de cultivo de macrófagos residentes (Mac R) y Mac inducidos (Mac I) de cavidad peritoneal de ratón. Sin Inductor (Sin Ind), Medio Condicionado de Mac R (MCMac R), MCMac I e Interleucina-1 beta recombinante humana (rhIL-1 $\beta$ ). Existe diferencia ( $P=0.05$ ) entre a con b, c y d, pero entre las tres últimas no la hay. También hay diferencias entre e con f, g y h, al igual que entre f y g ( $P=0.005$ ).

LA IL-1 Y EL M-CSF, PERO NO EL G-CSF, IL-2 O LPS, INDUCEN LA EXPRESION DE RECEPTORES Fc

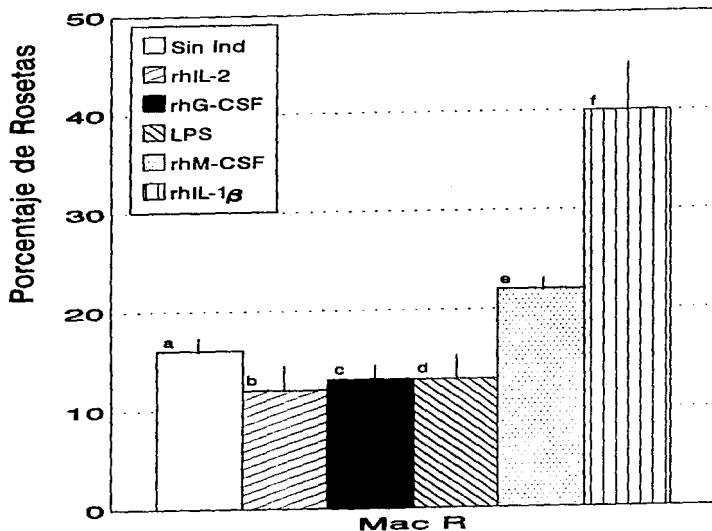


Figura 8. Porcentaje de macrófagos residentes (Mac R) peritoneales de ratón con receptores Fc (FcR) después de dos días de cultivo sin inductor (Sin Ind), interleucina-2 recombinante humana (rhIL-2), Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (rhG-CSF), Lipopolisacárido (LPS), Macrófagos (rhM-CSF) e Interleucina-1beta (rhIL-1 $\beta$ ). Entre a, b, c, y d no hay diferencias, pero si entre a con e y f, y entre e y f ( $P=0.001$ ).

### **Dosis respuesta a la inducción de receptores Fc de macrófagos residentes de ratón por rhIL-1 $\beta$ .**

Siendo la rhIL-1 $\beta$  un fuerte inductor de la expresión de receptores Fc en Mac R, se consideró indispensable establecer la dosis a la cual el factor induce una máxima respuesta. Con esta finalidad incubamos  $4 \times 10^5$  Mac R con o sin 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.0, 6.0 y 12 ng/mL de rhIL-1 $\beta$  durante 2 días de cultivo. Se encontró que a concentraciones de 0.05 ng/mL se observa ya un incremento en la inducción a la expresión de Fc $\gamma$ R y que 0.8 ng/mL son suficientes para alcanzar la máxima expresión (Figura 9).

### **Los macrófagos autoregulan sus niveles de receptores Fc.**

Teniendo como antecedentes que los macrófagos en cultivo producen y liberan la IL-1 $\beta$  (Lisi, et al 1987), era de esperar que a medida que al aumentar el tiempo de cultivo de Mac R no estimulados, también se incrementara el porcentaje de células con receptores Fc, como consecuencia de la producción de la IL-1 $\beta$ . Cuando se evaluó la expresión de receptores Fc en esta población cultivada sin inductor por 1, 2, 4 y 8 días, el porcentaje de células con receptores Fc se incrementa gradualmente en función del tiempo de cultivo, de 7 % en el primer día hasta 50% en el octavo. Como era de esperarse la adición de 0.8 ng/mL de rhIL-1 $\beta$  mostró un efecto aditivo en la inducción de Fc $\gamma$ R (Figura 10).

Con la finalidad de determinar si la IL-1 $\beta$  producida por los propios macrófagos era la responsable de inducir la expresión de receptores Fc en los cultivos de Mac R, se utilizó el anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  (0.3  $\mu$ g/mL) para evaluar si era capaz de bloquear la expresión de nuevos receptores Fc. Por esta razón, se comparó el porcentaje de células con receptores Fc al inicio y después de 2 días de cultivo con y sin la presencia de IL-1 $\beta$  y de anticuerpo anti-rhIL-1 $\beta$ . Los resultados indican que se inhibió la inducción de células con receptores Fc cuando fueron expuestas el anticuerpo anti-rhIL-1 $\beta$ . Encontramos que al inicio del cultivo (día cero) los Mac R presentaban un 5% de células con receptores Fc y de sólo 6% después de dos días ya sea en presencia del anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  o de rhIL-1 $\beta$  + anti-rhIL-1 $\beta$ , en cambio el cultivo sin inductor mostró un incremento significativo ( $P=0.001$ ) de autoinducción hasta un 11 % y en presencia de rhIL-1 $\beta$

**LA IL-1 INDUCE LA EXPRESION DE RECEPTORES Fc EN FORMA DOSIS  
DEPENDIENTE**

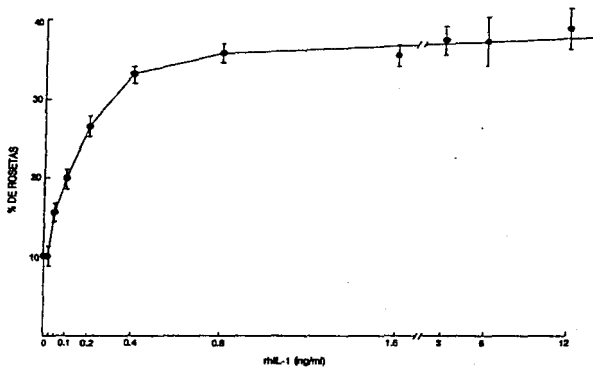


Figura 9. Porcentaje de macrófagos residentes de cavidad peritoneal de ratón que expresan receptores Fc después de dos días de cultivo en ausencia y presencia de diferentes dosis de Interleucina-1 beta recombinante humano (rhIL-1 $\beta$ ).

**AUTO-INDUCCION DE LA EXPRESION DE RECEPTORES Fc EN LOS  
MACROFAGOS.**

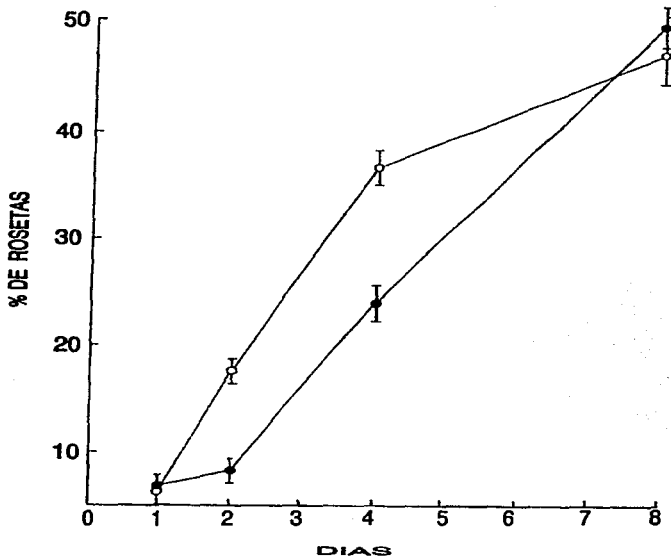


Figura 10. La autoinducción a la expresión de receptores Fc en macrófagos peritoneales en cultivo es tiempo-dependiente. (●) Células cultivadas sin inductor o con (○) interleucina-1 beta recombinante humano (rhIL-1 $\beta$ ) (0.8 ng/ml).



exógena hasta un 20 % (Figura 11). Un efecto similar fue obtenido al usar una población de Mac I.

Existe la posibilidad de que el anticuerpo se una a los receptores Fc de tal forma que impida la formación de rosetas y no como consecuencia de la inhibición de la expresión de los receptores. Los datos indican que éste no es el caso ya que las células tratadas con IL-1 $\beta$  por 48 horas y en la última media hora incubadas con anti-rhIL-1 $\beta$ , no modificaron significativamente ( $P=0.001$ ) la formación de rosetas promovidas por la rhIL-1 $\beta$  (Figura 11).

Interesantemente la expresión de receptores Fc promovida por el MCMac R, fuente de FcRI, también fue significativamente ( $P=0.001$ ) reducida (Figura 11), pero la inhibición no fue tan contundente como la observada en presencia de la rhIL-1 $\beta$ , ya que fue similar al testigo sin inductor.

Los cultivos de 3 días en presencia del anticuerpo anti-rhIL-1 $\beta$ , existe inhibición de la expresión de los Fc $\gamma$ R, pero el efecto no se observa en forma contundente ya que en estas condiciones el porcentaje de células con Fc $\gamma$ R fue del 10 %, mientras que el cultivo sin inductor subió hasta un 19 %.

La autoinducción a la expresión de Fc $\gamma$ R aún en presencia de anti-rhIL-1 $\beta$  después de 3 días de cultivo, podría deberse a la producción de la IL-1 $\alpha$  o del factor de necrosis tumoral (TNF), sobre todo considerando que la IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se unen al mismo receptor y desencadenan las mismas actividades biológicas, mientras que el TNF muestra actividad biológica traslapada con la IL-1, además tanto la IL-1 $\alpha$  como el TNF son producidas por los macrófagos (Schütze, et al 1994). Con la finalidad de evaluar la probable participación de cada uno de estos factores en la inducción de Fc $\gamma$ R, se cultivaron macrófagos en presencia y ausencia de rhIL-1 $\alpha$  y rhTNF $\alpha$ . Los resultados indican que sólo la rhIL-1 $\alpha$  indujo la expresión de Fc $\gamma$ R (Figura 12). Estos datos sugieren que tanto la IL-1 $\alpha$  como la IL-1 $\beta$  son responsables de la autoinducción de receptores Fc en macrófagos.

Para confirmar los resultados se realizaron ensayos de inmunoelectrotransferencia (Western blot) y revelado con el anticuerpo policlonal de conejo anti-rmIL-1 $\beta$ , en donde detectamos que el MCMac R contiene IL-1 $\beta$  (Figura 13), aunque tanto la rmIL-1 $\beta$  (de 17,000 daltones) como la IL-1 $\beta$  del MCMac R mostraron tener un peso molecular de

**ANTICUERPOS ANTI-IL-1 BETA INHIBE  
LA AUTO-INDUCCION DE  
RECEPTORES Fc EN Mac R.**

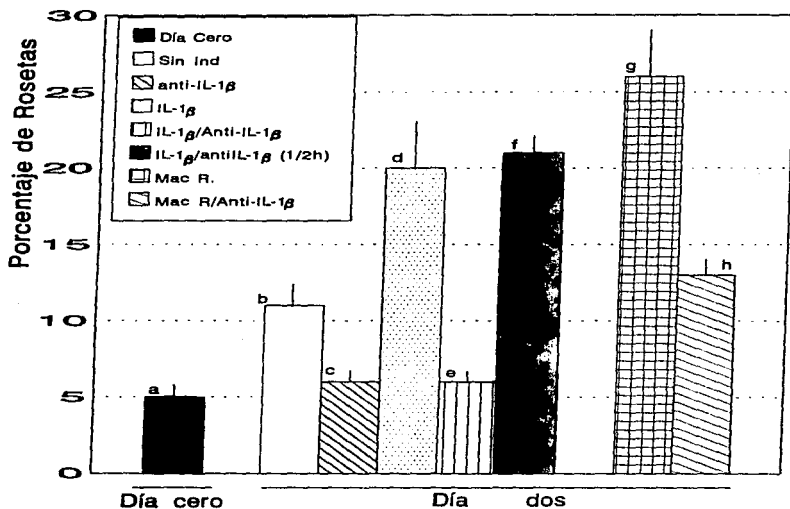


Figura 11. Porcentaje de macrófagos peritoneales de ratón con receptores Fc al inicio (día cero) y dos días después del cultivo Sin Inductor (Sin Ind), Interleucina-1 beta (rhIL-1 $\beta$ ), Anticuerpo anti-rhIL-1 $\beta$  (anti-IL-1 $\beta$ ) y Medio condicionado de Macrófagos Residentes con o sin anti-IL-1 $\beta$  (MCMac R, MCMac R+anti-IL-1 $\beta$ ). No existe diferencia significativa entre a, c y e, tampoco entre b y h y entre d, f y g. Sí la hay entre a con b, d, f, g y h, lo mismo ocurre entre b y h con d, f y g (P=0.001).

LA IL-1 ALFA PERO NO EL TNF ALFA  
INDUCE LA EXPRESION DE RECEPTORES  
Fc

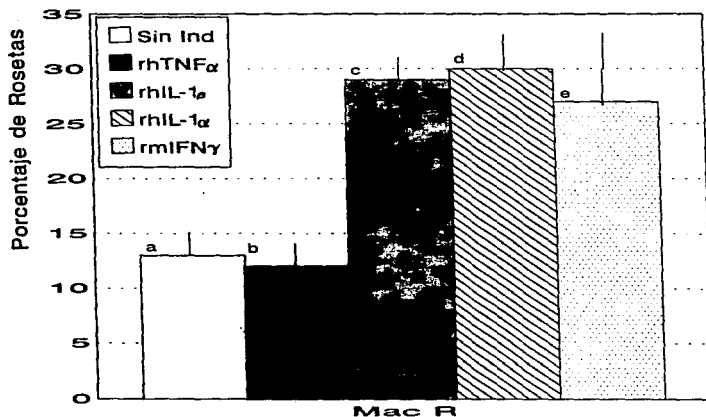
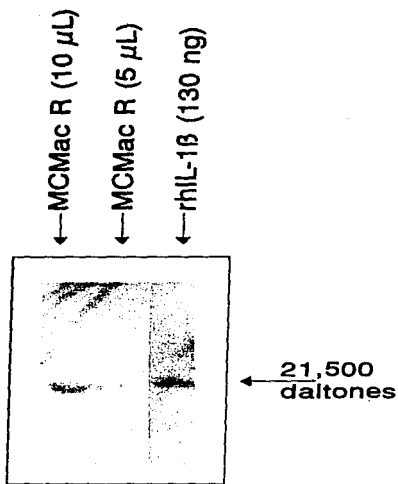


Figura 12. Porcentaje de macrófagos residentes (Mac R) con receptores Fc después de dos días de cultivo con Interferon-gamma recombinante de ratón (rmIFN $\gamma$ ) e Interleucina-1 beta y alfa recombinante humano (rhIL-1 $\beta$ , rhIL-1 $\alpha$ ). Factor de Necrosis Tumoral alfa recombinante humano (rhTNF $\alpha$ ) o sin inductor (Sin Ind). Entre a y b no hay diferencias significativas, tampoco entre c, d y e, pero sí entre a con c, d y e (P=0.001).



**Figura 13.** El MCMac R, usado como fuente de FcRI, contiene IL-1 $\beta$  detectado después de una inmunoelectrotransferencia (IET) revelado con un anticuerpo policlonal anti-rhIL-1 $\beta$ . El peso molecular es de 22,500 daltones. El MCMac R fue concentrado 18 veces.

aproximadamente 22,500 daltones. Esta serie de datos permite establecer que la actividad de FcRI contenida en el MCMac R es por la presencia de la IL-1. Un ensayo de inmunoprecipitación del MCMac R y del MC de la línea promielocítica humana HL-60 (células que no producen IL-1; Grande, et al 1995) con un anticuerpo de cabra anti-rhIL-1 $\beta$ , confirman que sólo el MCMac R contiene IL-1 $\beta$  (Figura 14).

**La rhIL-1 $\beta$  favorece la fagocitosis dependiente pero no la independiente de anticuerpos.**

Los macrófagos fagocitan partículas por dos rutas, una dependiente y la otra independiente de anticuerpo (Kuster and Schauer, 1981). Para que pueda darse la fagocitosis dependiente de anticuerpo se requiere de la participación de los receptores Fc (inmunofagocitosis) (Greenberg and Silverstein, 1993). Considerando que la rhIL-1 $\beta$  induce la expresión de Fc $\gamma$ R, existía la posibilidad que también favoreciera la inmunofagocitosis. Se encontró que las células macrofágicas que forman rosetas después de ser estimuladas con rhIL-1 $\beta$ , también incrementan significativamente ( $P=0.001$ ) su capacidad de fagocitar eritrocitos cubiertos con anticuerpo, pasando de un 7 % sin inductor hasta un 14 % con rhIL-1 $\beta$ . Sin embargo, estos macrófagos no presentaron la capacidad de fagocitar eritrocitos sin anticuerpo ni partículas de látex. Por lo anterior consideramos que, bajo estas condiciones, la rhIL-1 $\beta$  parece favorecer sólo la inmunofagocitosis.

**Los Fc $\gamma$ R inducidos por la rhIL-1 $\beta$  y el interferón-gamma recombinante de ratón (rmIFN $\gamma$ ) son de diferente tipo.**

El IFN $\gamma$  es una clásica citocina inductora de receptores Fc $\gamma$ RI tanto en macrófagos como en granulocitos y cuya actividad es especie específica. Con la finalidad de determinar si los Fc $\gamma$ R inducido por la rhIL-1 $\beta$  y el interferon gamma recombinante de ratón (rmIFN $\gamma$ ) son de diferente tipo, se utilizaron los anticuerpos anti-Fc $\gamma$ RI (32) anti-Fc $\gamma$ RII (IV.3) (Medarex, Inc. Annandale, NJ, USA), dirigidos contra los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII humanos respectivamente (Erbe, et al 1990). Para ello incubamos Mac R con o sin 0.8 ng/mL de rhIL-1 $\beta$  y 100 U/mL de rmIFN $\gamma$  como testigo positivo para la inducción a la

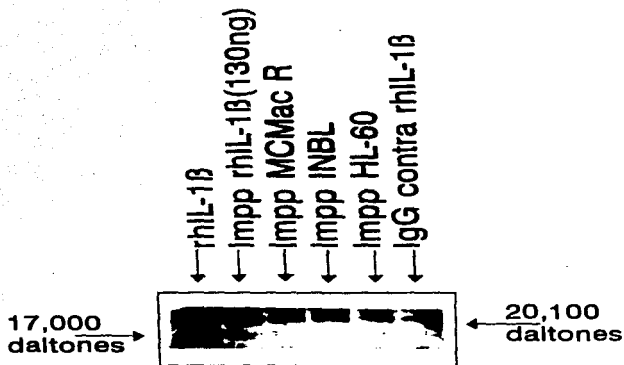


Figura 14. El MCMac R, usado como fuente de FcRI, contiene IL-1 $\beta$  detectado después de una inmunoprecipitación (Impp) con anticuerpo de cabra anti-rhIL-1 $\beta$  acoplada a proteína G-sefarosa. Como control se usó el MC de la línea celular INBL, un carcinoma de origen cérvico-úterino (Impp-INBL), y la línea celular promielocítica humana HL-60 (Impp-HL-60). También se muestra el precipitado del anticuerpo anti-rhIL-1 $\beta$  pero sin antígeno (IgG contra rhIL-1 $\beta$ ), y rhIL-1 $\beta$  sin inmunoprecipitar (rhIL-1 $\beta$ ). 40  $\mu$ L de cada medio, concentrado 30 veces, fue usado para la inmunoprecipitación.

expresión del receptor Fc tipo I (FcγRI) (Erbe, et al 1990). Después de 2 días en cultivo añadimos por 30 min 0.3 μg/mL de anticuerpo anti-FcγRI y anti-FcγRII, posteriormente se agregaron los eritrocitos activados para la formación de rosetas y así cuantificar el porcentaje de células que fueron inhibidas a formar rosetas y por ende, determinar el tipo de FcγR inducido. Los resultados muestran que los receptores inducidos por la rhlL-1β fueron bloqueados por ambos anticuerpos indicando la presencia de FcγRI y FcγRII, en tanto que las células estimuladas con el rmIFNγ sólo fueron bloqueadas con el anticuerpo anti-FcγRI, lo cual indica la presencia de FcγRI en estas células (Figura 15).

**La rhlL-1β no induce la expresión FcγR en granulocitos-neutrófilos de ratón.**

La población fagocítica esta constituida por granulocitos y macrófagos, los dos grupos celulares expresan receptores Fc en forma constitutiva y ambas expresan un mayor número de receptores Fc ante el estímulo con el IFNγ (Fanger, et al 1989b). Con el antecedente de que la rhlL-1β induce la expresión de receptores Fc en macrófagos, consideramos pertinente establecer si los granulocito-neutrófilos respondían en forma similar. Los resultados señalan que la rhlL-1β no indujo y tampoco impide en forma significativa (P=0.001) la expresión de receptores Fc en los neutrófilos a diferencia del rmIFNγ (Figura 16), adicionalmente se confirma que los FcγR inducidos por el rmIFNγ sólo son bloqueados por el anticuerpo anti-FcγRI humano (Figura 16). Se usaron diferentes dosis tanto de la rhlL-1β como de la rhlL-1α, y diferentes tiempos de incubación, pero los resultados fueron similares. Cabe señalar que después de dos días de cultivo, ni el rmIFNγ muestra esta actividad.

Debido a que la rhlL-1β no indujo la expresión de FcγR en los neutrófilos maduros, existía la posibilidad de que se diera un efecto positivo en células más primitivas. Para someter a prueba esta hipótesis se cultivaron, en medio semisólido, células de médula ósea (500,000/caja 15x 60 mm) por 7 días en presencia del rhG-CSF combinado o no con la rhlL-1β. Los resultados indican que el 90 % de las colonias generadas (1400 colonias en promedio por caja de petri) fueron de tipo granulocito-neutrófilos, pero sólo un 3 % de las células expresaron FcγR, independientemente del estímulo con la rhlL-1β. En cambio se obtuvo un incremento de 3 % al 10 % en células macrofágicas generadas con rhM-CSF

LA IL-1 Y EL IFN INDUCEN DIFERENTES TIPOS  
DE RECEPTORES Fc

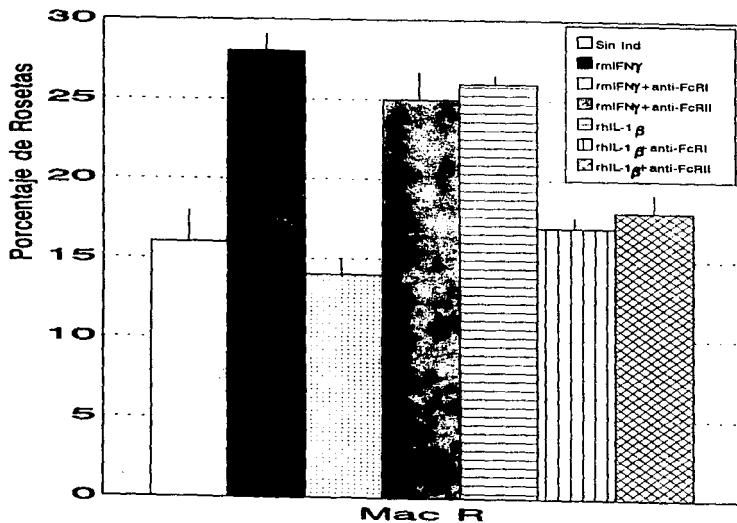


Figura 15. Porcentaje de macrófagos residentes con receptores Fc después de dos días de cultivo Sin Inductor (Sin Ind), Interferon-gamma recombinante de ratón (rmlFN $\gamma$ ), Interleucina-1b recombinante humana (IL-1 $\beta$ ), en presencia y ausencia de anticuerpos anti-receptor Fc $\gamma$ I (anti-Fc $\gamma$ RI) y II (anti-Fc $\gamma$ RII). No hay diferencia entre a, c, f y g, tampoco entre b, d y e, pero si existe entre a, c, f y g con b, d y e ( $P=0.001$ ).



LA IL-1 NO INDUCE LA EXPRESION DE RECEPTORES Fc EN LOS GRANULOCITO-NEUTRÓFILOS DE RATON

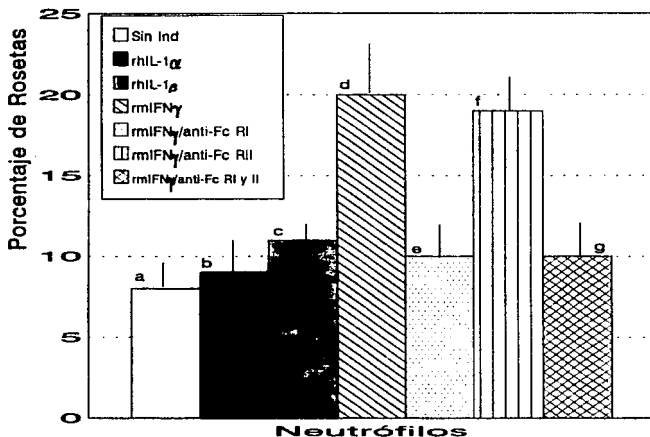


Figura 16. Porcentaje de neutrófilos con receptores Fc después de un día de cultivo con Interferon-gamma recombinante de ratón (rmIFN $\gamma$ ), en presencia o ausencia del anticuerpo anti-Fc $\gamma$ RI o anti-Fc $\gamma$ RII, Interleucina-1 beta y alfa recombinante humano (rhIL-1 $\beta$ , rhIL-1 $\alpha$ ) o sin inductor (Sin Ind). No existe diferencia significativa entre a, b, c, e y g, tampoco entre d y f, pero si lo hay entre estos dos últimos con todos los demás (P=0.001).

(200 colonias), o rhM-CSF+rhIL-1 $\beta$  (250 colonias) respectivamente, en ambos casos el 98 % de las células fueron de tipo macrofágicas.

#### **La rhIL-1 $\beta$ no induce la expresión de Fc $\gamma$ R en linfocitos de ratón.**

Aunque los linfocitos no son células fagocíticas también expresan receptores Fc (Sandor and Lynch, 1992) y además portan receptores para IL-1 (McKean, et al 1994), por lo tanto se podría suponer que esta molécula, pudiera inducir la expresión de receptores para Fc en los linfocitos, igual como ocurre con los macrófagos. Con esta finalidad se procedió a cultivar por 1, 2, 3 y 4 días  $5 \times 10^5$  células de timo y bazo de ratón como fuente de linfocitos en presencia y ausencia de 0.8 ng/mL de la rhIL-1 $\beta$ . Como se desconoce la existencia de un factor que promueva la expresión de receptores Fc en linfocitos, decidimos usar cultivos de Mac R provenientes de los mismos ratones como testigo positivo del ensayo. En ninguno de los diferentes días de cultivo, se observó la inducción de Fc $\gamma$ R en linfocitos por la rhIL-1 $\beta$  (Figura 17). La inducción a la proliferación de linfocitos con fitohemaglutinina y la rhIL-1 $\beta$  y o variando la dosis de este factor no modificaron el resultado.

#### **Inducción de Fc $\gamma$ R en líneas de células mieloides de ratón por la rhIL-1 $\beta$ .**

Los Mac R utilizados en estos experimentos provienen de la cavidad peritoneal de ratón y aunque se utilizaron métodos de purificación que permitieron obtener un enriquecimiento mayor del 95 %, no se puede perder de vista que otros tipos celulares presentes pudieran haber influenciado los resultados ya descritos. En consecuencia procedimos a trabajar con líneas celulares considerando que son más homogéneas. Por tanto se procedió a evaluar el efecto que la rhIL-1 $\beta$  pudiera ejercer en la modulación de la expresión de receptores Fc en líneas celulares de tipo macrofágico. Se cultivaron  $2.5 \times 10^5$  células de las líneas WR19M.1 y WEHI3Bd- por 4 días en cajas de petri de 35 x 10 mm en presencia y ausencia de 12 ng/mL de rhIL-1 $\beta$ . Como el G-CSF induce la diferenciación morfológica de WEHI3Bd- (Souza, et al 1986) se consideró pertinente evaluar si también era capaz de inducir la expresión de receptores para Fc, por esta razón se incluyeron en estos experimentos los cultivos con 200 ng/mL de rhG-CSF. También se utilizaron 1000 U/mL

## LA IL-1 NO INDUCE LA EXPRESION DE RECEPTORES Fc EN LINFOCITOS DE RATON

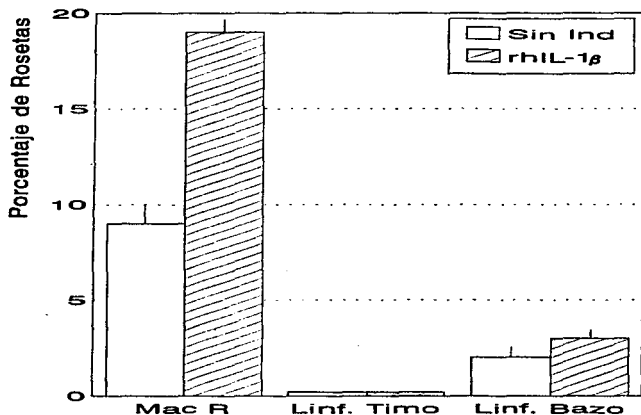


Figura 17. Porcentaje de macrófagos residentes y linfocitos de timo y bazo de ratón con receptores Fc después de 3 días de incubación sin inductor (Sin Ind) o con la Interleucina-1 $\beta$  (rhIL-1 $\beta$ ). No existe diferencia ( $P=0.001$ ) en la inducción de receptores Fc en linfocitos ante el estímulo con la IL-1.

de rhIL-2 como un factor no relacionado directamente con la mielopoiesis, y cultivos sin ningún inductor como testigos negativos. Los resultados indican que la rhIL-1 $\beta$  fue la única molécula que estimuló significativamente ( $P=0.001$ ) la expresión de receptores Fc en ambas líneas celulares (Figura 18). Tomando en consideración que la producción de lisozima es uno de los parámetros empleados para medir la diferenciación terminal de las células mieloides (Ruhl and Pluznik, 1993), se evaluó si la rhIL-1 $\beta$  también inducía la producción de lisozima en estas líneas leucémicas. Al realizar las determinaciones no se detectó incremento de la enzima en el sobrenadante de los cultivos de WR19M.1 y WEHI3Bd-. El empleo de Mac R confirmó nuestras observaciones con las líneas leucémicas ya que la rhIL-1 $\beta$  y el rmIFN $\gamma$  no favorecieron significativamente la producción de lisozima, a diferencia ( $P=0.001$ ) de la interleucina-6 recombinante humana (rhIL-6) (Figura 19), datos que señalan que la rhIL-1 $\beta$  tiene una restricción en la diferenciación y o activación de macrófagos y que son necesarios otros factores para completar este proceso..

#### **La rhIL-1 $\beta$ induce la expresión de Fc $\gamma$ R en monocitos de sangre periférica humana (SPH).**

La mayoría de estudios realizados sobre la regulación de la expresión de receptores Fc se han realizado con leucocitos de SPH. Así fue como se estableció por vez primera que el IFN $\gamma$  regula positivamente la expresión de receptores Fc en granulocitos y monocitos humanos (Ball, et al 1983, Perussia, et al 1983). Con el antecedente de que la rhIL-1 $\beta$  induce la expresión de receptores Fc en macrófagos normales y líneas leucémicas de ratón, consideramos de sumo interés determinar si este factor muestra el mismo efecto sobre los leucocitos humanos. Con este propósito procedimos a cultivar por 3 días  $5 \times 10^5$  células mononucleadas totales de SPH en presencia, o ausencia, de 0.8 ng/mL de rhIL-1 $\beta$ . Empleamos 100 U/mL de interferón- $\gamma$  recombinante humano (rhIFN $\gamma$ ) como testigo positivo del experimento. Así mismo empleamos 1000 U/mL de rhIL-2 como factor que modula las actividades biológicas de linfocitos pero no de células mieloides, y cultivos sin inductor como testigos negativos. Los resultados indican que la rhIL-1 $\beta$  induce la

## LA IL-1 INDUCE LA EXPRESION DE RECEPTORES Fc EN LINEAS LEUCEMICAS DE RATON

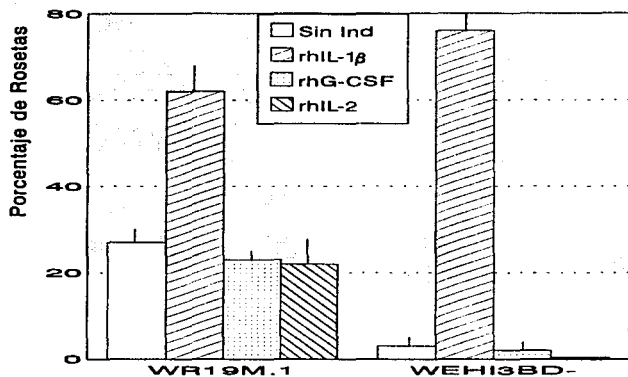


Figura 18. Porcentaje de células leucémicas de tipo macrófago WR19M.1 y promielocítico WEHI3BD- que expresan receptores Fc después de 4 días de cultivo sin inductor (Sin Ind), Interleucina-1 $\beta$  (rhIL-1 $\beta$ ), Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (rhG-CSF) e Interleucina-2 (rhIL-2). Sólo la IL-1 indujo la expresión de receptores Fc en forma significativa (P=0.001)

LA IL-1 NO INDUCE LA PRODUCCION DE LISOZIMA EN Mac R.

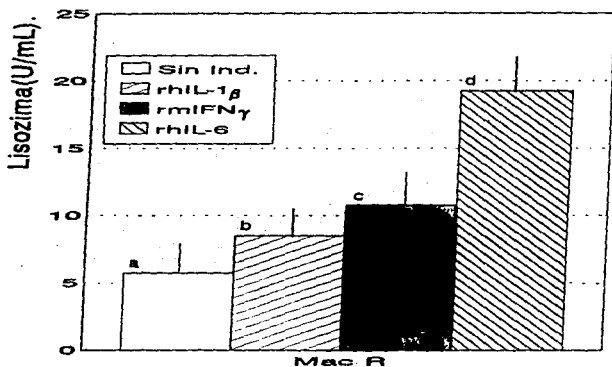


Figura 19. Producción de lisozima por macrófagos peritoneales de ratón después de 2 días de cultivo Sin inductor (Sin Ind), Interleucina-1 beta recombinante humana (rhIL-1 $\beta$ ), rhIL-6, e Interferon gamma recombinante de ratón (rmIFN $\gamma$ ). No existe diferencia en la producción de lisozima entre a, b y c, pero todos difieren con d (P=0.001).

expresión de Fc $\gamma$ R en células mononucleadas en forma similar al efecto promovido por el rhIFN $\gamma$  (Tabla 6).

CELULAS MONONUCLEADAS DE SANGRE PERIFERICA HUMANA  
SON INDUCIDAS A EXPRESAR RECEPTORES Fc CON IL-1 $\beta$ .

FACTORES	ENSAYO 1	ENSAYO 2
Sin Inductor	7 $\pm$ 0.5	20 $\pm$ 1.0
Interleucina-2	10 $\pm$ 0.5	19 $\pm$ 1.0
Interleucina-1 $\beta$	19 $\pm$ 0.0	38 $\pm$ 3.5
Interferon- $\gamma$	25 $\pm$ 0.5	47 $\pm$ 0.5

Tabla 6. Porcentaje de células mononucleadas totales de sangre periférica humana normal con receptores Fc después de 3 días de cultivo con los diferentes inductores.

La población mononuclear de SPI está constituida principalmente por monocitos y linfocitos. Ambas poblaciones pueden separarse por la capacidad de adherencia de monocitos al sustrato de cultivo. Con este procedimiento se obtuvo que las células adherentes estaban constituidas por un 90 % de monocitos y las del sobrenadante por un 95 % de linfocitos. Células de ambas poblaciones ( $3 \times 10^5$ /mL) fueron cultivadas por 2 días en presencia y ausencia de 0.8 ng/mL de rIL-1 $\beta$  y 100 U/mL de rhIFN $\gamma$  y 1000 U/mL de rIL-2. Los datos reflejan que sólo la población de monocitos fue inducida a expresar receptores Fc en respuesta a la rIL-1 $\beta$  y al rhIFN $\gamma$  (Figura 20).

#### La rIL-1 $\beta$ induce la expresión de Fc $\gamma$ R en la línea leucémica humana U937

Considerando que la población de monocitos estaba constituida por sólo un 90 %, no se descarta la posibilidad de que las células contaminantes puedan modificar los resultados. Por lo anterior se consideró pertinente usar una línea celular monocítica para asegurar la homogeneidad celular. La línea celular monocítica humana U-937 ha sido usada ampliamente para caracterizar moléculas que promuevan la expresión de Fc $\gamma$ R. Por ello cultivamos por 4 días  $2 \times 10^5$  células de U-937 en presencia y ausencia de 0.8 ng/mL de rIL-1 $\beta$ . Se empleó 100 U/mL de rhIFN $\gamma$  como control positivo, ya que se había reportado

**LA IL-1 INDUCE LA EXPRESION DE RECEPTORES Fc EN MONOCITOS PERO NO EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA HUMANA**

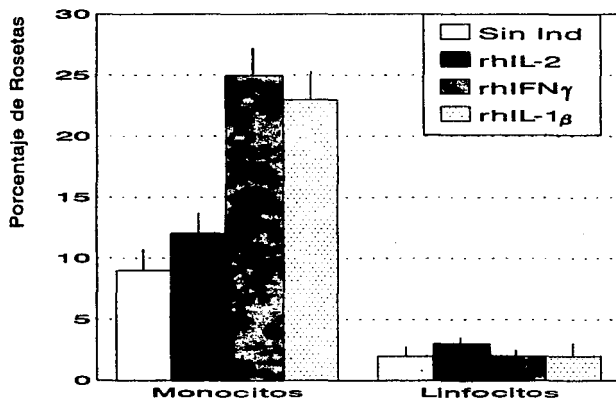


Figura 20. Porcentaje de monocitos y linfocitos de sangre periférica humana con receptores Fc después de 3 días de cultivo. Sólo el tratamiento de monocitos con IFN e IL-1 muestran respuesta similar y difiere significativamente ( $P=0.001$ ) con el cultivo sin inductor o con IL-2.



que era el único factor responsable de inducir la expresión de receptores Fc en esta línea celular (Erbe, et al 1990), y un cultivo sin inductor como control negativo. Los resultados indican que la rhlL-1 $\beta$  moduló positivamente la expresión de receptores Fc en esta línea celular (Figura 21).

LA IL-1 INDUCE LA EXPRESION DE  
RECEPTORES Fc EN LA LINEA LEUCEMICA  
HUMANA U-937.

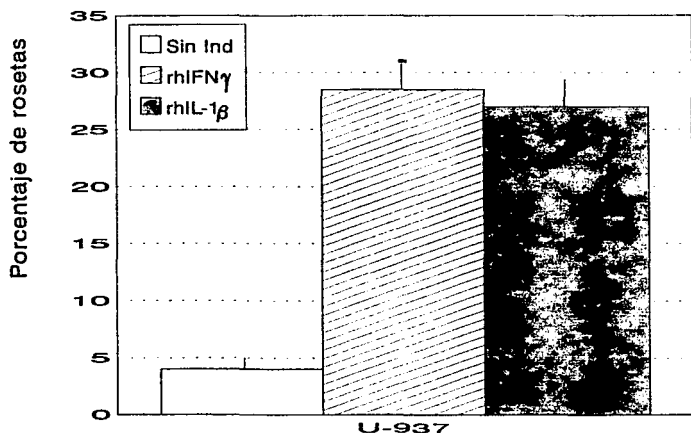


Figura 21. Porcentaje de células de la línea leucémica monocítica humana U-937 con receptores Fc (FcR) cultivadas durante 4 días Sin Inductor (Sin Ind), Interferón- (rhIFN $\gamma$ ) e Interleucina-1b (rhIL-1 $\beta$ ). Ambas citocinas inducen significativamente la expresión de receptores Fc (P=0.001) con respecto al negativo

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Existen varias citocinas (IFN, TGF, IL-6 y G-CSF) reconocidas como moduladores positivos de la expresión de los Fc $\gamma$ R (Ruhl and Pluznik, 1993, Hulett and Hogarth, 1994), y en este trabajo se demuestra que también la rhlL-1 $\beta$  ejerce este tipo de actividad. La IL-1 actúa exclusivamente en células del linaje monocito-macrófago, que son las células principales para presentara al antígeno a los linfocitos. Como la IL-1 también induce la activación de linfocitos, entonces es de esperar que esta molécula juegue un papel importante en el reconocimiento inmunológico, ya que interactua con las principales células involucradas en esta respuesta.

En este trabajo encontramos que tanto la rhlL-1 $\beta$  como la rhlL-1 $\alpha$  promueven la expresión de Fc $\gamma$ R en macrófagos, pero no en neutrófilos, ni en linfocitos. Aunque existía la posibilidad de que tal actividad fuese mediada por otra citocina, sobre todo conociendo que la IL-1 induce a su vez la secreción de otras citocinas, consideramos que la IL-1 es una citocina directamente inductora de Fc $\gamma$ R, ya que las citocinas liberadas por los macrófagos relacionadas con la posible inducción de este tipo de receptores (G-CSF y TNF) no mostraron tener una actividad significativa, mientras que el M-CSF sólo lo hace en forma reducida, pero estadísticamente significativa, en nuestras condiciones de experimentación. El bloqueo de la expresión del Fc $\gamma$ R por el anticuerpo anti-rhlL-1 $\beta$  (Figura 11), confirma la participación de la rhlL-1 $\beta$  en este evento. Es poco probable que el efecto sea atribuible a la IL-6, ya que este es un inductor de lisozima (Ruhl and Pluznik, 1993), pero en los sobrenadantes de los cultivos, la actividad de esta enzima sólo fue incrementada significativamente en presencia de IL-6 (Figura 19). También es poco probable que el efecto sea atribuible al LPS, ya que a pesar de las evidencias de que los cultivos de tejidos contaminados con LPS inducen la expresión de Fc $\gamma$ R (Sachs, 1987a), la adición del LPS a los cultivos no mostró ningún efecto significativo (Figura 8).

Una de las primeras evidencias sobre la participación de una citocina secretada por macrófagos en la inducción de Fc $\gamma$ R y que sirvió de punto de partida para el presente estudio, fueron publicadas a inicios de los años 80 bajo el nombre de FcRI, un factor producido por macrófagos con un punto isoelectrico de 7.2, peso molecular de 17 000 daltones y con una fuerte actividad inductora a la expresión de Fc $\gamma$ R en células de médula ósea de ratón (Calcagno, et al 1982, Fragoso, et al 1985). Esta molécula y la IL-1 comparten no sólo las mismas propiedades moleculares, sino también el mismo origen y actividad celular. En el presente trabajo se confirma que tanto el FcRI como la IL-1 inducen

la expresión de Fc $\gamma$ R en las células de médula ósea y en macrófagos residentes de ratón, y que ambos factores son reconocidos por el mismo anticuerpo anti-IL-1 $\beta$ . Otro antecedente que apoya parcialmente nuestras observaciones se publicó a finales de los años 80 (Onozaki, et al 1987), en donde se señala a la rhIL-1 $\beta$  como un modulador positivo de la expresión de Fc $\gamma$ R en la línea leucémica mieloide de ratón M1; sin embargo, se menciona la necesidad de la presencia de LPS para el efecto inductor. Es probable que el requerimiento de LPS se deba a que la M1 usada en dicho estudio (Onozaki, et al 1987), es una célula primitiva y no madura como los macrófagos. El LPS más la IL-1, inducen la producción de la IL-6 y recientemente se demostró que este factor modula positivamente la expresión de los Fc $\gamma$ R en las células M1 (Ruhl and Pluznik, 1993), por tanto la inducción de Fc $\gamma$ R mediado por la IL-1 y LPS observado por Onozaki, probablemente sea una consecuencia de esta red de interacciones entre los factores señalados.

La observación de que el LPS no induce la expresión de Fc $\gamma$ R ha sido publicada anteriormente y se demuestra que junto con la rhIL-1 $\beta$  inhibe la expresión de este tipo de receptores cuando son inducidos por el IFN $\gamma$ , en monocitos y granulocito-neutrófilos de sangre periférica humana, y en las células de la línea leucémica macrófagica humana THP1 (Arend, et al 1987), aunque algunos datos presentados por estos autores señalan a la IL-1 como un inductor de Fc $\gamma$ R. Pensamos que el bloqueo observado en sus células mononucleares de sangre periférica se puede deber a la producción de la IL-4 por los linfocitos y basófilos presentes, ya que es uno de los fuertes inhibidores de la expresión de Fc $\gamma$ R y de la producción de la propia IL-1 (Hulett and Hogarth, 1994, Chomarat, et al 1995) (ver capítulo de Receptores Fc e Interleucina-1).

En relación a la autoinducción de Fc $\gamma$ R en macrófagos demostrada en este trabajo, se puede sustentar en el hecho de que los macrófagos son conocidos como las células con mayor capacidad de síntesis de IL-1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$ , aunque esta última en cantidades reducidas (Lisi, et al 1987). Evidentemente, es de esperarse que a medida que aumente el tiempo de cultivo, se incremente la concentración de IL-1 en el sobrenadante (Eischen, et al 1994), lo que explicaría la presencia, en nuestros resultados, de un mayor porcentaje de células con receptores Fc en función del tiempo de cultivo (Figura 10) y que se requiere mínimamente de 50 pg/ml de IL-1 exógena para observar la inducción (Figura 9), cantidad que sólo puede ser producida después de 2 días de cultivo por  $2 \times 10^5$ /ml de macrófagos de cavidad peritoneal humano (Eischen, et al 1994). Estos resultados explican la fuerte autoinducción que observamos a los cuatro días de cultivo (Figura 10). Por otro lado nos indican que estamos trabajando con cantidades similares a las fisiológicas, ya que en suero normal se

detecta casi 0.5 ng/mL (Duff, 1989) y alguno individuos sanos tienen niveles más altos (Dinarelo, 1989b) lo cual refuerza nuestra hipótesis de que esta autoinducción se presenta *in vivo*.

La autoinducción parece ser mediada principalmente por la IL-1 $\beta$ , ya que la adición de anti-IL-1 $\beta$  por dos días inhibió la expresión de receptores Fc, sin embargo no se descarta la posibilidad de que la IL-1 $\alpha$  también participe. Existe una producción endógena de IL-1 $\alpha$ , pero sus niveles son entre un 20 a 50 % menores que el de la IL-1 $\beta$  (Demczuk, et al 1987), lo que implica que se requiere de más tiempo para que se alcance la concentración de 50 pg/ml de IL-1, cantidad requerida para iniciar la expresión de los receptores Fc.

Podría pensarse que otras citocinas como el TNF, una citocina también producida por macrófagos y que comparte muchas actividades con la IL-1, fuese el responsable de la autoinducción, sin embargo el TNF $\alpha$  utilizado tanto en nuestros experimentos como en los de otros investigadores (Michisita, et al 1990), no moduló positivamente la expresión de receptores Fc.

Cabe señalar que se utilizó la molécula completa del anticuerpo policlonal de conejo anti-IL-1 $\beta$  humana, por lo cual era posible que se uniese al Fc $\gamma$ R por su porción Fc, pero no consideramos que haya sido el caso puesto que al utilizar un anticuerpo policlonal de conejo anti-IL-1 $\beta$  humana, por media hora, antes de agregar los eritrocitos no se detectó inhibición alguna (Figura 11).

Es un problema común de los sistemas murinos que los anticuerpos disponibles reconozcan antígenos humanos y por tanto no se tenga la seguridad que muestren reactividad cruzada. En este trabajo se utilizaron anticuerpos anti-Fc $\gamma$ R humano para bloquear la formación de rosetas, y se encontró que existe reactividad cruzada ya que sólo el anti-Fc $\gamma$ RI bloqueó tal actividad en aquellas células tratadas con el rmlNF $\gamma$  (Figura 15). Estos resultados son comprensibles puesto que se sabe que el rmlNF $\gamma$  induce principalmente receptores de tipo I y además los receptores Fc de ambas especies tienen una gran homología, no sólo estructural sino que también a nivel de aa (75 y 60 % de homología entre el Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII de ratón y humano respectivamente) (Hulett and Hogarth, 1994). El reconocimiento del anticuerpo a su antígeno, aún proveniente de otra especie, parece no ser exclusivo de los Fc $\gamma$ R, ya que también se ha observado reconocimiento de anticuerpos dirigidos contra G-CSF de humano sobre el G-CSF de ratón (Mora, et al 1992).

El uso de los anticuerpos anti-Fc $\gamma$ R humanos en células de ratón, también permitió establecer que la rhIL-1 $\beta$  era capaz de inducir la expresión tanto de Fc $\gamma$ RI, como del Fc $\gamma$ RII (Figura 15). Varios autores reportan que las citocinas no inducen la expresión del Fc $\gamma$ RII en los monocitos y macrófagos humanos (Buckle and Hogg, 1989, Hulett and Hogarth, 1994).

y sólo un estudio establece que la IL-6 también tiene la propiedad de inducir la expresión del FcγRII en la línea leucémica de ratón M1 (Chiu and Lee, 1989).

La IL-1β además de inducir la expresión de receptores Fc también activa a las mismas células al mostrar fagocitosis dependiente de anticuerpos (inmunofagocitosis), pero fue incapaz de promover otras actividades como la fagocitosis inespecífica y la producción de lisozima. La inducción de características limitadas de diferenciación y activación celular, parece no ser exclusiva de la IL-1, también se ha observado que el IFNγ sólo induce la expresión de FcγRI, pero no la secreción de lisozima en las células M1, a diferencia de la IL-6 que induce la expresión de ambas características (Ruhl and Pluznik, 1993). Lo anterior ejemplifica que en la diferenciación y activación celular participan varios factores, también es necesario evaluar si existe un fenómeno aditivo, o sinérgico, de estos factores en la expresión de los FcγR, eventos que son comunes en la proliferación de las células hematopoyéticas. Se encontró un incremento significativo en el porcentaje de células con FcγR en aquellas colonias que se generaron en presencia de rhM-CSF más rhIL-1β. Además, en contra de lo publicado por otros autores (Erbe, et al 1990), encontramos la inducción de FcγR por el rhM-CSF, lo cual consideramos factible ya que es un factor para la diferenciación morfológica de los precursores de macrófagos (Jacobsen, et al 1994a).

El rhG-CSF carece de la capacidad para inducir la expresión de los FcγR en macrófagos (Figura 8) sobre todo en los granulocito-neutrófilos. Inicialmente se pensó que se debía a la madurez de las células empleadas (neutrófilos segmentados), sin embargo los granulocitos generados a partir del cultivo de células precursoras en presencia de rhG-CSF, sólo o combinado con la rhIL-1β, tampoco expresaron receptores Fc. Resultados similares fueron obtenidos en la línea leucémica promielocítica WEHI3Bd- y la línea macrofágica de ratón WR19M.1 (Figura 18). Se ha demostrado que el G-CSF induce la diferenciación morfológica de WEHI3Bd- hacia el linaje (Souza, et al 1986), además también induce la expresión de los FcγR, tanto en los precursores como en células maduras del linaje granulocito-neutrófilos en humanos *in vivo* e *in vitro* (Kerst, et al 1993). El rhG-CSF muestra una actividad débil como inductor a la expresión de FcγR, en comparación al IFNγ (Kerst, et al 1993), lo que hace pensar que su actividad en ratón es reducida o nula. El uso del G-CSF de ratón y la cuantificación del rRNA para los FcγR podrían ayudar a esclarecer su participación en la inducción de los receptores Fc en esta especie.

Los linfocitos, al igual que los neutrófilos, tampoco fueron inducidos para expresar FcγR en presencia de la IL-1. La combinación de la fitohemaglutinina con la rhIL-1β

favoreció la proliferación, pero no la inducción a la expresión de Fc $\gamma$ R, resultado que no cambió con la variación de la concentración ni tiempo de exposición a la rhIL-1 $\beta$ . Cabe señalar que la técnica de rosetas, aunque sigue usándose en forma rutinaria por varios grupos de investigación, entre ellos el grupo de Ravetch (Takai, et al 1994), tiene la desventaja de que sólo detecta Fc $\gamma$ R a nivel de proteína anclada a membrana, por tanto no se debe descartar la posibilidad de que la IL-1 promueva la transcripción de RNAm para los Fc $\gamma$ R en este grupo de células, evaluación que ya es posible realizar puesto que ya se tiene el cDNA para los Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII de ratón.

Se piensa que la identificación de citocinas que regulen la expresión de Fc $\gamma$ R en linfocitos cobrará gran importancia en el futuro, sobre todo si consideramos que el Fc $\gamma$ RII expresado en linfocitos B, afecta seriamente la producción de anticuerpos (Ravetch, 1994). Estos estudios podrán ayudar a entender la biología básica del control de la producción de anticuerpos y probablemente ayuden a entender la producción patológica de auto-anticuerpos y en el mejor de los casos ofrecer opciones para controlarla..

La rhIL-1 $\beta$  también indujo la expresión de receptores Fc en monocitos, pero no en linfocitos de sangre periférica humana (Figura 20). Resultado que llamó mucho la atención, ya que se había reportado que la IL-1 no inducía la expresión de Fc $\gamma$ R en este grupo de células, incluso la responsabilizaban de inhibir la inducción mediada por el IFN $\gamma$  (Arend, et al 1987). Nuestros resultados pueden ser explicados en base al tiempo de exposición de las células a las citocinas. Por ejemplo, demostramos que los macrófagos de ratón y los monocitos humanos requieren una exposición de 48 horas o más con la IL-1 $\beta$  para observar la inducción a la expresión de receptores Fc. También contábamos con el antecedente de que el FcRI (ahora IL-1 $\beta$ ) requería de al menos 4 días para que las células de médula ósea de ratón expresaran estos receptores (Calcagno, et al 1982, Frago, et al 1985). En cambio en los trabajos donde no se le atribuye esta actividad, las células sólo fueron expuestas a las citocinas entre 16 y 24 horas, incluyendo al M-CSF (Arend, et al 1987), lo cual indica que las células no tuvieron el tiempo suficiente para finalmente expresar el receptor. Esta aseveración parece confirmarse en el mismo trabajo (Arend, et al 1987), puesto que las células de la línea leucémica humana de tipo macrófago THP1 incubadas por 48 h con la rhIL-1 $\beta$ , se favoreció la expresión de Fc $\gamma$ R, fenómeno que los autores no pudieron explicar porque su objetivo era demostrar que la IL-1 era un modulador negativo de estos receptores.

No existe un efecto antagonista de la IL-1 sobre la expresión de los Fc $\gamma$ R, puesto que en el cultivo de macrófagos de ratón por 48 horas en presencia de rhIL-1 $\beta$  más rmIFN $\gamma$  no se

observó tal efecto (Flores, et al 1996, datos no publicados). En todo caso el efecto antagonista reportado por Arend, (Arend, et al 1987), puede ser explicado en base a una alta tasa de internalización de receptores Fc promovido por la IL-1. De hecho las células NK tratadas con rhlL-1 $\beta$  muestran una disminución drástica de los niveles de Fc $\gamma$ RIII en su membrana plasmática en tan sólo 8 minutos, y a las 24 h se recuperan los valores normales (Liao and Simon, 1994).

En relación a las líneas leucémicas de ratón y humanas, todas fueron inducibles a la expresión de los Fc $\gamma$ R por la rhlL-1 $\beta$ . Lo anterior permite establecer que el efecto de la IL-1 es directo sobre las células macrofágicas y no sobre otro grupo de células y que las líneas celulares de ratón, una leucémica promielocítica (WEHI3Bd-) y la otra de tipo macrofágica (WR19M.1) (Figura 18), se suman a la M1 como modelos para realizar estudios de inducción de receptores Fc por citocinas.

Varias líneas leucémicas humanas han sido empleadas para el estudio de la inducción de los Fc $\gamma$ R por citocinas; U-937 y THP1 (de tipo macrofágica) y HL-60 (de tipo promielocítica). Nuestro grupo encontró que la IL-1 induce la expresión de Fc $\gamma$ R en la U-937, a pesar de que algunos autores establecen que ningún factor diferente a IFN $\gamma$  era capaz de inducir este tipo de receptores tanto en las células normales como en algunas líneas leucémicas ( U-937 y HL-60) (Erbe, et al 1990).

La modulación de la expresión de receptores Fc por la rhlL-1 $\beta$  y la rhlL-1 $\alpha$  en células de tipo macrofágico tiene mucha relevancia en el contexto inmunológico y principalmente porque se ha establecido que las células macrofágicas con Fc $\gamma$ R tienen mayor capacidad fagocítica y ésto se correlaciona con su capacidad para activar a los linfocitos T, responsables de montar la respuesta inmune celular y por activación de los linfocitos B, la respuesta humoral. En los ratones recién nacidos cuyos macrófagos carecen de los Fc $\gamma$ R no tienen la capacidad de mediar la fagocitosis via Fc $\gamma$ R (Starobinas, et al 1994), tampoco promueven la síntesis de anticuerpos (Argiris, 1968) y son incapaces de activar a los linfocitos (Lu, et al 1970). En cambio los macrófagos normales después de la fagocitosis producen algunas citocinas entre ellas la IL-1, la cual puede alcanzar una concentración de hasta 100 ng por millón de células en tan sólo 24 horas (Lisi, et al 1987), molécula que es muy importante para la activación de la respuesta inmune (ver capítulo de Interleucina-1). Por otro lado los antígenos provenientes del agente patógeno, después de ser degradados, son acoplados al complejo mayor de histocompatibilidad clase-II (MHC-II) y en estas condiciones son reconocidos por los linfocitos T (Germain and Marguiles, 1993).



Los anticuerpos producidos contra el antígeno forman complejos antígeno-anticuerpo, mismos que son fagocitados por los macrófagos vía FcγR, actividad que puede acelerarse con el suministro de la IL-1 exógena. Así la IL-1 parece ser promotora del desencadenamiento de la respuesta inmune a través de los linfocitos, y también asegura que los complejos antígeno-anticuerpo sean eliminados más eficientemente por los macrófagos, lo cual permite cerrar el circuito inmunológico "inmunidad natural-inmunidad específica" (Figura 22).

La IL-1 podría ser usada en aquellos casos donde la exposición a agentes infecciosos sea continua, como en hospitales o en investigaciones biomédicas, o por aquellos individuos expuestos a un alto riesgo de infección, como en pacientes inmunodeprimidos o con cáncer (Nakamura, et al 1986). La IL-1 puede ser usada como un agente profiláctico, puesto que señalan que animales tratados con IL-1 son menos sensibles a los efectos letales provocados por una inyección de bacterias (Ozaki, et al 1987, Minami, et al 1988). Para su aplicación se debe tener en cuenta que produce varios efectos secundarios que pueden causar la muerte (ver capítulo de Interleucina-1).

En leucemias (M1 a M6) se reporta hasta un 33 % de casos negativos tanto para FcγRI como para FcγRII, mientras que el FcγRIII fue aún menos frecuente (Ball, et al 1989). Si consideramos que los tres tipos de FcγR están involucrados en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ver capítulo de Receptores Fc), y al menos el FcγRIII ha sido implicado en la inducción de apoptosis (Azzoni, et al 1995), entonces la ausencia de los FcγR podría impedir el cierre del circuito inmunológico en el que participa la IL-1.

Las células de algunos pacientes leucémicos producen IL-1, pero su participación en la expresión de los FcγR en estas células se desconoce. Sin embargo, los datos reportados en el presente trabajo indican que al menos las células leucémicas de linaje monocito-macrófagos pueden ser inducibles mediante la IL-1, incluso se observó que la presencia de este factor inhibió el crecimiento de las células leucémicas de tipo promielocítica WEHI3Bd- y de tipo macrofágica WR19M.1. La IL-1 inhibe el crecimiento de algunas células tumorales, incluyendo timomas y células leucémicas de ratón M1, propiedad que le permitió ser considerado como un agente diferenciador (Onozaki, et al 1985, 1988). En este contexto y conociendo que las enfermedades neoplásicas no son sencillas de manejar y mucho menos de eliminar, sería interesante evaluar si la IL-1 es capaz de inducir la expresión de FcγR en las células de estos pacientes. De ser así se tendría la esperanza de que estas células puedan recuperar su capacidad fagocítica y por ende participar en la defensa inmune y proveer una mejor calidad de vida en estos pacientes.

## PARTICIPACION DE LA IL-1 EN LA DESTRUCCION DE PATOGENOS

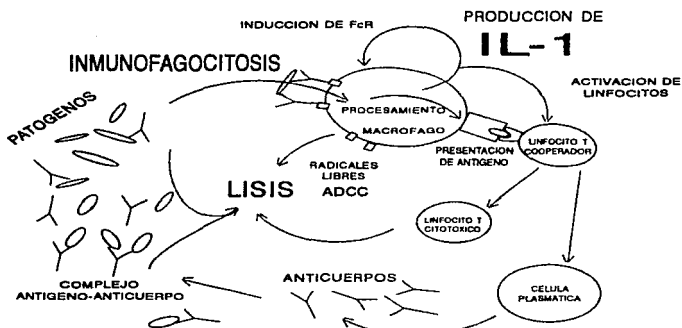


Figura 22. La IL-1 se produce después de la fagocitosis. Esta activa la generación de células plasmáticas productoras de anticuerpo y T citotóxicas. Induce la expresión de FcR en macrófagos y estimula la inmunofagocitosis. Los FcR activados inducen la liberación de radicales libres. Esta compleja interacción se encamina a la rápida eliminación del patógeno, donde la IL-1 parece ser el regulador principal. (Red de interacción propuesta en base a los resultados y datos bibliográficos).

Finalmente, los pacientes con enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR) y esclerosis múltiple (EM), tienen altos niveles de la IL-1 en el suero. Considerando que la IL-1 es un agente proinflamatorio (ver capítulo de Interleucina-1), se le responsabiliza de la inflamación en estos pacientes. De hecho se ha observado que existe una producción reducida del antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1Ra) y una síntesis normal de la IL-1, incluso se ha observado que la inyección del IL-1Ra abate la reacción inflamatoria (Chomarat, et al 1995). Además las citocinas como la IL-4, IL-10 e IL-13 también tienen propiedades anti-inflamatorias y existen evidencias que señalan que esta actividad es por la producción del IL-1Ra (Atkins, et al 1992, Chomarat, et al 1995).

En este marco de padecimientos autoinmunes, la IL-1, como un factor inductor de Fc $\gamma$ R, puede ser fundamental para explicar la reacción inflamatoria, ya que es producida por las células en el sitio de la inflamación y por quimiotaxis atrae células inflamatorias como neutrófilos y monocitos (Colotta, et al 1993). A su vez las células macrófágicas atraídas pueden ser inducidas a expresar receptores Fc y como consecuencia presenten actividad de ADCC, o fagocitosis (Wallace, et al 1994), contra componentes del propio organismo ya sean antígenos celulares o componentes de la matriz extracelular. La activación de los macrófagos vía receptores Fc favorece la producción y liberación de radicales libres en el sitio de la inflamación con lo que se acentuaría la lesión (Dinarello, 1992). Dentro de la transducción de señales generadas por la activación del Fc $\gamma$ R por su ligando se encuentran aquellas que desencadenan la síntesis de RNAm para algunas citocinas, entre ellas la IL-6, M-CSF y GM-CSF (van de Winkel, and Capel, 1993, Nishikomori, et al 1995), moléculas que participan en la hematopoyesis y diferenciación de células de linaje monocito-macrófago y granulocitos (Sachs and Lotem, 1994). La producción de citocinas garantiza el suministro de un mayor número de células inflamatorias.

Se ha reportado que las células inflamatorias de algunos pacientes con enfermedades autoinmunes, particularmente los monocitos de pacientes con LES (Fries, et al 1984, Boros, et al 1993), así como en las células de microglía en pacientes con esclerosis múltiple, tienen incrementados los niveles de Fc $\gamma$ R (Ulvestad, et al 1994) y es probable que hayan sido inducidos por la IL-1. Por otro lado, el suero de pacientes con enfermedades autoinmunes como LES, existen autoanticuerpos contra los tres tipos de Fc $\gamma$ R (Boros, et al 1993). La expresión incrementada de Fc $\gamma$ R en monocitos y la presencia de anticuerpos contra los Fc $\gamma$ R, son la combinación ideal para desencadenar la respuesta inflamatoria (ver capítulo de Receptores Fc), ya que la unión de anticuerpo al Fc $\gamma$ R provoca la liberación de diversos agentes inflamatorios (Wallace, et al 1994).

La IL-4 ha sido catalogada como inhibidora de la expresión de los FcγR (Hulett and Hogarth, 1994), que por cierto puede contribuir para explicar su actividad anti-inflamatoria (Atkins, et al 1992, Chomarat, et al 1995). La IL-4 puede modular ambas actividades sólo por el hecho de inducir la producción del IL-1Ra, ya que este antagonista puede bloquear la actividad de la IL-1 y con ello la expresión de los FcγR, incluso hay datos que señalan que la IL-4 inhibe la citotoxicidad de los macrófagos (Oswald, et al 1992), actividad en la que la participación de los receptores Fc es imprescindible (ver receptores Fc), por lo que sería muy interesante evaluar si el IL-1Ra tiene la propiedad de inhibir la expresión de receptores Fc en este contexto.

Los FcγR pueden tener un papel más relevante del que por ahora se les atribuye, tanto en el marco de la respuesta inmune normal como en la anormal. Por lo anterior, la identificación de todos los factores que regulan positiva y negativamente su expresión será fundamental para entender tal participación y en el mejor de los casos ser una herramientas para controlar esta actividad.

## BIBLIOGRAFIA

- Alcami, A., and Smith, G.L. (1992) A soluble receptor for interleukin-1 $\beta$  encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell* 71: 153.
- Alexander, H.R., DeBorja, G.M., Busch, C.M., Venzon, D.J., and Norton, J.A. (1991) A recombinant human receptor antagonist to interleukin 1 improves survival after lethal endotoxemia in mice. *J Exp Med* 173: 1029.
- Allen, J.M., and Seed, B. (1989) Isolation and expression of functional high affinity Fc receptor complementary DNAs. *Science* 243: 378.
- Allen, T.D., and Dexter, T.M., Simmons, P.J. (1990) Marrow biology and stem cell. In Dexter, T.M., Garland, J.M., Testa, N.G. (ed.): *Colony-Stimulating Factors: Molecular and Cellular Biology*. Marcel Dekker, New York. pp 1-38.
- Amann, M.J., Keller, U., Derigs, G., Mohamadzadeh, M., Huber, C., Peschel, C. (1994) Regulation of cytokine expression by interferon- $\gamma$  in human bone marrow stromal cells: inhibition of hematopoietic growth factors and induction of interleukin-1 receptor antagonist. *Blood* 84: 4142.
- Amigorena, S., Bonnerot, C., Drake, J.R., Chiquet, D., Hunziker, W., Guillet, J.G., Wester, P., Sautes, C., Mellman, I., and Fridman, W.H. (1992) Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science* 256: 1308.
- Anderson, C.L., and Abraham, G.N. (1980) Characterization of the Fc receptor for IgG on a human macrophage cell line U937. *J Immunol* 125: 2735.
- Anderson, C.L., Guyre, P.M., Whitin, J.C., Ryan, D.H., Leoney, R.J., and Fanger, M.W. (1986) Monoclonal antibodies to Fc receptors for IgG on human mononuclear phagocytes: Antibody characterization and induction of superoxide production in a monocyte cell. *J Biol Chem* 261: 12856.
- Anderson, C.L., Shen, L., Eicher, D.M., Wewers, M.D., and Gill, J.K. (1990) Phagocytosis mediated by three distinct Fc receptor classes on human leukocytes. *J Exp Med* 171: 1333.
- Aoki, Y., Homori, M., Nakamura, K., Hagiuchi, K., and Ishikawa, K. (1995) Effects of rhIL-1 $\alpha$ , rhIL-1 $\beta$  and rhIL-1 receptor antagonist on erythroid progenitors (CFU-E and BFU-E) in human bone marrow. *Exp Hematol* 23: 217.
- Arend, W.P. (1993). Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* 54: 167.
- Arend, W.P., Aronson, J.T., and Kotzin, B.L. (1987) Lipopolysaccharide and interleukin 1 inhibit interferon- $\gamma$ -induced Fc receptor expression on human monocytes. *J Immunol* 139: 1873.
- Argiris, B.F. (1968) Role of macrophages in immunological maturation. *J Exp Med* 128: 459.
- Astier, A., de la Salle, H., de la Salle, C., Bieher, T., Esposito-Farese, M.E., Freund, M., Cazenave, J.P., Fridman, W.H., Teillard, J.L., and Hanau, D. (1994) Human epidermal langerhans cells secrete a soluble receptor for IgG (Fc $\gamma$ RIID3) that inhibits the binding of immune complexes to Fc $\gamma$ R cells. *J Immunol* 152: 201.
- Atkins, E. (1984) Fever: historical aspects. In Bonford and Henderson (eds.), *Interleukin-1, inflammation and disease*. Elsevier, New York. pp. 3 - 15.
- Atkins, M.B., Vachino, G., Tolg, H.G., Karp, D.D., Robert, N.J., Kappler, K., and Mier, J.W. (1992) Phase I evaluation of thrice-daily intravenous bolus interleukin-4 in patients with refractory malignancy. *J Clin Oncol* 10: 1802.
- Auron, P.E., Webb, A.C., Rosenwasser, L.J., Mucci, S.F., Rich, A., Wolf, S.M., and Dinarello, C.A. (1984). Nucleotide sequence of human monocyte interleukin-1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 7907.
- Auron, P.F., and Webb, A.C. (1994) Interleukin-1: a gene expression system regulated at multiple levels. *Eur Cytokine Netw* 5: 573.
- Azzoni, L., Anegón, Y., Calabretta, B., and Perussia, B. (1995) Ligand binding to Fc $\gamma$ 1 induces  $\alpha$ -*mye*-dependent apoptosis in IL-2-stimulated NK cells. *J Immunol* 154: 941.
- Bagby, G.C. (1989). Interleukin-1 and hematopoiesis. *Blood Rev* 3: 152.
- Ball, E.D., Guyre, P.M., Shen, L., Glynis, J.M., Maliszewski, C.R., Baker P.E., and Fanger, M.W. (1983). Gamma interferon induces monocytoid differentiation in the IL-60 cell line. *J Clin Invest* 73: 1072.
- Ball, E.D., Modermoot, J., Griffin, J.D., Davey, F.R., Davis, R., and Bloomfield, C.D. (1989) Expression of the three myeloid cell-associated immunoglobulin G Fc receptor defined by murine monoclonal antibodies on normal bone marrow and acute leukemia cells. *Blood* 73: 1951.
- Ban, E.M.H., LeRoith, R.D. (1994) Suppressin: An endogenous negative regulator of immune cell activation. *Immunol Res* 13: 1.
- Bazan, F. (1990). Structural desing and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6934.
- Beasley, D., Cohen, R.A., and Levinsky, N.G. (1989). Interleukin 1 inhibits contraction of vascular smooth muscle. *J Clin Invest* 83: 331.
- Beasley, D., Schwartz, J.L., and Brenner, B.M. (1991). Interleukin 1 induces prolonged L-arginine-dependent cyclic guanosine monophosphate and nitric production in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 87: 602.
- Bendizien, K. (1994) Cytokines and natural regulators of cytokines. *Immunol Lett* 43: 111.
- Bendizien, K., Mandrup-Poulsen, T., Nerup, J., Nielsen, J.H., Dinarello, C.A., and Svenson, M. (1986). Cytotoxicity of human  $\gamma$  T-interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans. *Science* 232: 1548.
- Beneuch, P.D., Sestry, K., Iyer, R.R., Eichbaum, G.G., Revsh, D.P., and Ezekowitz, A.S. (1992). Definition of interferon- $\gamma$  response elements in a novel human Fc receptor gene (Fc $\gamma$ IIIb) and characterization of the gene. *J Exp Med* 176: 1115

- Berardi, A.C., Wang, A., Levine, J.D., Lopez, P., Scadden, D.T. (1995). Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science*. 267:104.
- Bergers, G., Reikerstorfer, A., Brusemann, S., Gräninger, P., and Busslinger, M. (1994). Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene *Fcγ1* generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. *EMBO J.* 13: 1176.
- Bianco, C., Patrick, R., Nussenzweig, V. (1970). A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody complement complexes. I. Separation and characterization. *J Exp Med.* 132: 702.
- Bird, T.A., Sleath, P.R., deRoos, P.C., Dower, S.K., and Vireca, G.D. (1991). Interleukin-1 represents a new modality for the activation of extracellular signal-related kinases/microtubule-associated protein-2 kinases. *J Biol Chem.* 266: 22661.
- Bone, R.C. (1993). Toward and epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *JAMA*. 268: 3452.
- Boros, P., Muryoi, T., Sjvera, H., Bona, C., and Unkeles, J.C. (1993). Autoantibodies directed against different classes of *FcγR* are found in sera of autoimmune patients. *J Immunol.* 150: 2018.
- Boros, P., Odin, J.A., Muryoi, T., Masur, S.K., Bona, C., and Unkeles, J.C. (1991). IgM anti-*FcγR* autoantibodies trigger neutrophil degranulation. *J Exp Med.* 173: 1473.
- Boydens, S.V., and Sorkin, E. (1960). The adsorption of antigen by spleen cells previously treated with anti-serum in vitro. *Immunology*. 3: 272.
- Brankman, E., van de Winkel, J.G.J., van Krimpen, B.A., Jansz, M., and Houthuis, R.L.H. (1993). CD16 on human  $\gamma\delta$  T lymphocytes: Expression, function and specificity for mouse IgG-isotypes. *Cell Immunol* 143: 97.
- Bradley, T.R., and Metcalf, D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 44: 287.
- Bradley, T.R., Williams, N., Krieger, A.B., Fawcett, J., and Hodgson, G.S. (1989). In vivo effects of interleukin 1 alpha on regenerating mouse bone marrow myeloid colony forming cells after treatment with 5-fluorouracil. *Leukemia* 3: 893.
- Brakebusch, C., Noplar, Y., Kemper, O., Engelmann, H., and Wallach, D. (1992). Cytoplasmic truncation of the p55 tumour necrosis factor (TNF) receptor abolishes signaling, but not induced shedding of the receptor. *EMBO J.* 11: 943.
- Brooks, D.G., Qui, W.Q., Luster, A.D., and Ravetch, J.V. (1989). Structure and expression of a human IgG FcRII (CD32): Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes. *J Exp Med.* 170: 1369.
- Bueckle, A., and Hogg, N. (1989). The effect of IFN- $\gamma$  and colony stimulating factors on the expression of neutrophil cell membrane receptors. *J Immunol.* 143: 2295.
- Caceres-Cortez, R., and Hoang, T. (1992). Product of the steel locus can replace leukemic cell interaction. *Cancer Res.* 52: 5208.
- Calagano, M., Pérez, J. R., Waldo, M.G., Cabrera, G., Weiss-Stender, B. (1982). Evidence of the existence of a factor that induces Fc receptors on bone marrow cells. *Blood.* 59: 756.
- Calagano, M., Rios, R., Frigoso, A., Areiga, M.A., Cabrera, G., Torres, R., Weiss-Stender, B. (1983). Evidence of the existence of a factor that induces C<sub>3</sub> receptors on bone marrow cells. *Blood.* 61: 403.
- Cambier, J.C., Pleiman, C., and Clark, M.R. (1994). Signal transduction by the B cell antigen receptor and its co-receptors. *Annu Rev Immunol.* 12: 457.
- Cantley, L. C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., Soltoff, S. (1991). Oncogenes and signal transduction. *Cell.* 64: 281.
- Casati, D.L., Keller, M.A., Surrey, S., Schwartz, E., Schreiber, A.D., Rappaport, E.F., and McKenzie, S.E. (1993). Differential expression of *FcγRIIA*, *FcγRIID* and *FcγRIIC* in hematopoietic cells. *Analysis of transcripts.* *Mol Immunol.* 30: 43.
- Carretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A., March, C.J., Kronheim, S.R., Druck, T., Cannizzaro, L.A., Huebner, K., and Black, R.A. (1992). Molecular cloning of the IL-1 $\beta$  processing enzyme. *Science* 256: 97.
- Cocconi, F., Leuzzi, G., and Dinarello, C.A. (1988). Occurrence of interleukin 1 in cerebrospinal fluid of the conscious cat. *Brain Res.* 446: 245.
- Coligan, J.E. (1992). Isolation and analysis of proteins. In Coligan, J.E., Kuisabeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Strober, W. editors: *Current protocols in immunology*. J Wiley & Sons, New York. pp 8.01-8.12.9.
- Colotta, F., Re, F., Muzio, M., Bertini, R., Polentarutti, N., Sironi, M., Giri, J.G., Dower, S.K., Sims, J.E., Mantovani, A. (1993). Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 261: 472.
- Coman, D., Lyman, S.D., Idzerda, R.L., Beckmann, M.P., Park, L.S., Goodwin, R.G., March, C.J. (1990). A new cytokine receptor family. *Trends Biochem Sci.* 15: 265.
- Coustinho, L.H., Will, A., Radford, J., Schiro, R., Testa, N.G., Dexter, T.M. (1990). Effects of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (CSF) human granulocyte-macrophage-CSF and gibberon interleukin 3 on hematopoiesis in human long-term bone marrow culture. *Blood.* 75: 2118.
- Crockett-Torabi, E., and Fantone, J. C. (1990). Soluble and insoluble immune complexes activate human neutrophil NADPH oxidase by distinct *Fcγ* receptor-specific mechanisms. *J Immunol.* 145: 3026.

- Crown, J., Jakubowski, A., and Gabrilove, J. (1995). Interleukin-1: Biological effects in human hematopoiesis. In *Martelmann, R., and Herrmann, F. (de): Hematopoietic growth factors in clinical applications. Second Edition.* Marcel Dekker, New York. pp 189.
- Crump, J., Ge, H., L. J., Aron, P.E., Webb, A.C., Stinski, M.F., and IJunninghake, G.W. (1992). The immediate early genes of human cytomegalovirus require only proximal promoter elements to upregulate expression of interleukin-1 $\beta$ . *Amer J Respir Cell Mol Biol* 6: 674.
- Chiu, C.P., and Lee, F. (1989). IL-6 is a differentiation factor for M1 and WEHI-231 myeloid leukemic cells. *J Immunol* 142: 1909.
- Chenoua, P., Vannier, E., Dechanet, J., Rissano, M.C., Danchevici, J., Dinarello, C.A., and Miossec, P. (1995). Balance of IL-1 receptor antagonist/IL-1 $\beta$  in rheumatoid synovium and its regulation by IL-4 and IL-10. *J Immunol* 154: 1432.
- D'Andrea, A.D. (1994). Hematopoietic growth factors and the regulation of differentiative decision. *Current Opinion in Cell Biol* 6: 804.
- Dacron, M., Malbec, O., Bonacerto, C., Latour, S., Segal, D.M., and Fridman, W.H. (1994). Tyrosine-containing activation motif-dependent phagocytosis in mast cells. *J Immunol* 152: 1.
- Dacron, M., Provost-Danon, A., and Vainin, G. (1980). Mast cell mitogens and factors responsible in anaphylaxis. II. Functionally distinct receptors of IgG and IgE on mouse mast cells. *Cell Immunol* 49: 178.
- Dayer, J.M., de Rochemonteix, B., Burris, B., Demczuk, S., and Dinarello, C.A. (1986). Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. *J Clin Invest* 77: 645.
- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G., and de Vries, J.E. (1991). Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174: 1209.
- Debets, J.M.H., van de Winkel, J.G.J., Ceuppens, J. L., Dieteren, L.E.M., and Baurnan, W.A. (1990). Crosslinking of both Fc $\gamma$ R1 and Fc $\gamma$ R2 induces secretion of tumor necrosis factor by human monocytes, requiring high-affinity Fc $\gamma$ R interactions. *J Immunol* 144: 1304.
- Demczuk, S., Baumberger, C., Mach, B., Dayer, J.M. (1987). Expression of human IL-1 alpha and beta messenger RNAs and IL-1 activity in human peripheral blood mononuclear cells. *J Mol Cell Immunol* 5: 255.
- Dewhirst, F.E., Slishenko, P.P., Wolf, J.E., et al (1985). Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin-1-beta. *J Immunol* 135: 2562.
- Dexter, T.M. (1989). Haemopoietic growth factor. *Brit Med Bulletin* 45: 337.
- DiDonato, J.A., Mercurio, F., and Karin, M. (1995). Phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  precedes but is not sufficient for its dissociation from NF $\kappa$ B. *Mol Cell Biol* 15: 1303.
- Dietsch, E., Osman, N., McKenzie, I.F.C., Garson, O.M., and Hogarth, P.M. (1993). The human FCGI gene encoding the high-affinity Fc $\gamma$ R1 maps to chromosome 1q21. *Immunogenetics* 38: 307.
- Dinarello, C.A. (1989a). Interleukin-1 and its related cytokines. In *Sorg, C. (ed.): Macrophage-derived cell regulatory factors. Cytokines. Vol. 1.* Ed. Karger, Basel, Switzerland. pp 105-154.
- Dinarello, C.A. (1989b). Fever. In *Bonfanti, R., and Henderson (ed) Interleukin-1, inflammation and disease.* Elsevier, New York. pp 175-190.
- Dinarello, C.A. (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77: 1627.
- Dinarello, C.A. (1992). The biology of interleukin-1. In *Kishimoto, T. (ed.): Interleukins: Molecular biology and immunology.* Chem Immunol, Basel, Karger. 51: 1.
- Dinarello, C.A. (1994a). The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw* 5: 117.
- Dinarello, C.A. (1994b). The interleukin-1 family 10 years of discovery. *FASEB J* 8: 1314.
- Dinarello, C.A., Cannon, J.G., Wolf, S.M., et al (1985). Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces interleukin-1. *J Exp Med* 163: 1433.
- Dinarello, C.A., Ikejima, T., Warner, S.J., Orencole, S.F., Lonnemann, G., Cannon, J.G., and Libby, P. (1987). Interleukin 1 induces interleukin 1: Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cell in vitro. *J Immunol* 139: 1902.
- Dinarello, C.A., Renfer, I., Wolff, S.M. (1977). Human leukocyte pyrogen: purification and development of a radioimmunoassay. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 4624.
- Dower, S.K., Favalow, W., Jacobs, C., Waugh, S., Sims, J.E., and Widmer, M.B. (1994). Interleukin-1 antagonists. *Therapeutic Immunol* 1: 113.
- Dudding, L.S., Haak, S., Clark, B.D., Aron, P.E., Sporn, S., and Huang, E.S. (1989). Cytomegalovirus infection stimulates expression of monocyte-associated inducer genes. *J Immunol* 143: 3343.
- Duff, O. (1989). Interleukin-1 in inflammatory joint disease. In *Bonfanti, R., and Henderson. (ed) Interleukin-1, inflammation and disease.* Elsevier, New York. pp 243-255.
- Eischen, A., Duxlos, B., Schmitt-Coguel, M., Rouyer, N., Bergerat, J.P., Hummel, M., Oskam, R., and Oberling, Fr. (1994). Human resident peritoneal macrophages: phenotype and biology. *British J Haematol* 88: 712.
- Eisenberg, S., Brewer, M.T., Verderber, E., Heimold, P., Brandhuber, B.J., and Thompson, R.C. (1991). IL-1 receptor antagonist is a member of the IL-1 gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5232.
- Ellingsworth, J.E., Rosen, D.M., Fink, K., Rosen, D.M., Bentz, H., Prez, K.A., Seyedin, S.M. (1986). Antibodies to the N-terminal position of cartilage inducing factor-A and transforming growth factor- $\beta$ . *J Biol Chem* 261: 12362.

- Erbe, D.V., Collins, J.E., Shen, L., Graziano, R.F., and Fanger, M.W. (1990). The effect of cytokines on the expression and function of Fc receptors for IgG on human myeloid cells. *Mol Immunol*, 27:57-67.
- Ernst, L.-K., van de Winkel, J.G.J., Chiu, I.M., and Anderson, C.I. (1992). Three genes for the human high affinity Fc receptor for IgG (Fc $\gamma$ R) encode four distinct transcription products. *J Biol Chem*, 267: 15692.
- Ernst, T.J., Ritchie, A.R., Demetri, G.D., and Griffin, J.D. (1989). Regulation of granulocyte and monocyte colony stimulating factor mRNA levels in human blood monocytes is mediated primarily at a post-transcriptional level. *J Biol Chem*, 264: 7000-7004.
- Evans, D.B., Bunning, R.A., and Russell, R.G. (1990). The effects of recombinant IL-1 beta on cellular proliferation and the production of PGE $_2$ , plasminogen activator, osteocalcin and alkaline phosphatase by osteoblast-like cells derived from human bone. *Biochem Biophys Res Commun*, 166: 208.
- Evans, R.J., Dray, J., Childs, J.D., Vigners, G.P.A., Brundhuber, D.J., Skaliczky, J.J., Thompson, R.C., and Eisenberg, S.P. (1995). Mapping receptor binding sites in the IL-1 receptor antagonist and IL-1 $\beta$  by site-directed mutagenesis: identification of a single site in IL-1ra and two sites in IL-1 $\beta$ . *J Biol Chem*, 270: 11477.
- Fanger, M.W., Graziano, R.F., Shen, L., and Guyre, P.M. (1989a). Fc $\gamma$ R cytotoxicity exerted by mononuclear cells. *Clin Immunol*, 47:214.
- Fanger, M.W., Shen, L., Graziano, R.F., and Guyre, P.M. (1989b). Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG. *Immunol Today*, 10: 92.
- Feige, U., Karbowski, A., Rendorf-Adam, C., and Patank, A. (1989) Arthritis induced by continuous infusion of rh-interleukin-1a into the rabbit knee-joint. *Int J Tiss React*, 11: 225.
- Fenton, M.J., Vermeulen, M.W., Clark, B. D., Webb, A.C., and Auron, P.E. (1988) Human pro-IL-1 beta gene expression in monocyte cells is regulated by two distinct pathways. *J Immunol*, 140: 2267.
- Fibach, F., Hayashi, M., and Szeha, L. (1973). Control of normal differentiation of myeloid cells to macrophages and granulocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70: 343.
- Filbe, W.E., and Falkenburg, J.H.F. (1990). Regulation of hematopoiesis by interleukin-1. *Biotherapy*, 2: 325.
- Finkel, M.S., Odds, C.V., Jacob, T.D., Watkins, S.C., Hattler, B.G., and Simmons, R.L. (1992). Negative ionotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science*, 257: 387.
- Flores, E.A., Bistrain, R.Z., Pomposelli, J.J., Dinarello, C.A., Blackburn, G.L., and Isfhan, N.W. (1989). Infusion of tumor necrosis factor/cachectin promotes muscle catabolism in the rat. A synergistic effect with interleukin 1. *J Clin Invest*, 83: 1614.
- Fong, Y., Tracey, K.J., Moldawer, L.L., Hesse, D.G., Manogue, K.D., Kenney, J.S., Lee, A.T., Kuo, G.C., Allison, A.C., Lowry, S.F., and Cerami, A. (1989). Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 $\beta$  and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. *J Exp Med*, 170: 1627.
- Fragnoso, A., Arciga, M.A., Calcagno, M., Weiss, B. (1985). Determination of the inducer of Fc (FcR) and C3 (C3R) receptor on myeloid cells in several media from human and mouse origin and the identification of the macrophage as the cell that produces these factor. *Exp Hematol*, 13: 163.
- Fresney, M.C., Gaudon, F., Jover, E., Cowley, S., Hsuan, J., and Saklatvala, J. (1994). Interleukin-1 activates a novel protein cascade that results in the phosphorylation of I $\kappa$ Bp2. *Cell*, 78: 1039.
- Fries, L.F., Mullins, W.W., Cho, K.P., Plotz, P.H., and Frank, M.M. (1984). Monocyte receptor for the Fc portion of IgG are increased in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 132: 695.
- Furutani, Y. (1994). Molecular studies on interleukin-1a. *Eur Cytokine Netw*, 5: 533.
- Furutani, Y., Nozaki, M., Fukui, T., Ohue, M., Nomura, I., Yamada, M., Nakamura, S. (1986). Complete nucleotide sequence of the gene for human interleukin 1 alpha. *Nucleic Acids Res*, 14: 3167.
- Gagliardini, V., Fernandez, P. A., Lee, R.K.K., Drexler, I.C.A., Riello, R.J., Fishman, M.C., and Yuan, J. (1994). Prevention of vertebral death by the crna gene. *Science*, 263: 826.
- Gallin, J.I. (1993). Inflammation. In Paul, W.E. (ed.) *Fundamental immunology*. Third edition. Raven Press. New York. pp 1015-1032.
- Gallis, B., Prickett, K.S., Jackson, J., Slack, J., Schooley, K., Sims, J.E., and Dower, S.K. (1989). IL-1 induces rapid phosphorylation of the IL-1 receptor. *J Immunol* 143: 3235.
- Gasparotto, C., Levi, F., Abboud, M., Gillio, A., Smith, G., O'Reilly, R.J., and Moore, M.A.S. (1989). Effect of Interleukin-1 on hemopoietic progenitors: evidence of stimulatory and inhibitory activities in a primate model. *Blood*, 74: 547.
- Gasparotto, C., Smith, C., Gillio, A., Stopps, A., Muench, M., and Moore, M.A.S. (1990). Enrichment of peripheral blood stem cells with cytokine treatment in a preclinical primate model. *Blood*, 76 (suppl):541.
- Gasparotto, C., Smith, C., Gillio, A., Stopps, A., Muench, M., and Moore, M.A.S. (1990). Enrichment of peripheral blood stem cells with cytokine treatment in a preclinical primate model. *Blood*, 76 (suppl): 541.
- Germain, R.I.L., and Margules, D.M. (1993). The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol*, 11: 403.
- Gery, L., Waksman, B.H. (1972). Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediator(s). *J Exp Med*, 136: 143.
- Obizzi, P., Saccardo, D., Villa, P., et al (1986) Role of interleukin-1 in the depression of liver drug metabolism by endotoxin. *Infect Immun*, 54: 837.
- Gordon, M.Y., and Barrett, A.J. (1985). Bone marrow disorders; the biological basis of clinical problems. *Chapter 2: Haemopoietic precursor cells*. Blackwell Sci Publ London. pp 20-59.



- Grande, A., Manfredini, R., Tagliafico, E., Balistreri, R., Pizzanelli, M., Pappi, S., Zucchini, P., Boni, L., Diagnano, G., Torelli, U., Ferrari, S. (1995). All-trans-retinoic acid induces simultaneously granulocytic differentiation and expression of inflammatory cytokines in HL-60 cells. *Exp Hematol* 23: 117.
- Granowitz, E. V., Clark, B.D., Vannier, E., Callahan, M.V., and Dinarello, C.A. (1992). Effect of interleukin-1 (IL-1) blockade on cytokine synthesis: I. IL-1 receptor antagonist inhibits IL-1-induced cytokine synthesis and blocks the binding of IL-1 to its type II receptor on human monocytes. *Blood* 79: 2356.
- Gray, J.G., Chandra, G., Clay, W.C., Stinnett, S.W., Haneline, S.A., Lorenz, J.J., Patel, I.R., Wisely, G.B., Furdon, P.J., Taylor, J.D. and Kost, T.A. (1993). A CRE/ATF-like site in the upstream regulatory sequence of the human interleukin 1 $\beta$  gene is necessary for induction in U937 and THP-1 monocytic cell lines. *Mol Cell Biol* 13: 6678.
- Greenberg, S., and Silverstein, S.C. (1993). Phagocytosis. In Paul, W.E. (ed.) *Fundamental Immunology*, Third edition. Raven Press. New York. pp 941-964.
- Griffin, J.D., Cannistrà, S.A., Sullivan, R., Demetri, G.D., Ernst, T.J., and Kanakura, Y. (1990). The biology of GM-CSF: regulation of production and function by its receptor. *Int J Cell Cloning* 8 (Suppl. 1): 35.
- Gronich, J., Konieczkowski, M., Gelb, M.H., Nemenoff, R.A., and Sedor, J.R. (1994). Interleukin-1 $\alpha$  causes a rapid activation of cytosolic phospholipase A2 by phosphorylation in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 93: 1224.
- Guesdon, F., Freshney, N., Waller, R.J., Rawlinson, L., and Saklatvala, J. (1993). Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate two novel protein kinases that phosphorylate the heat shock protein hsp27 and beta-casasin. *J Biol Chem* 268: 4236.
- Hallek, M. (1995). Tyrosine kinases and phosphatases in hematopoietic growth factor signaling. In Mertelsmann, R., and Herrmann, F. (ed.): *Hematopoietic growth factors in clinical applications*. Second Edition. Marcel Dekker. New York. pp 19.
- Hallek, M., Draker, B., Lepisto, E.M., Wood, K.M., Ernst, T.J., Griffin, J.D. (1992). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and steel factor induce phosphorylation of both unique and overlapping signal transduction intermediates in a human factor dependent hemopoietic cell line. *J Cell Physiol* 153: 176.
- Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., and Ulevitch, R.J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cell. *Science* 265: 808.
- Hanzono, Y., Chiba, S., Sasaki, K., Mano, H., Miyajima, A., Arai, K., Yazaki, Y., Hirai, H. (1993) c-fps/fcs protein-tyrosine kinases is implicated in a signaling pathway triggered by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *EMBO J* 12: 1641.
- Hara, T., and Miyajima, A. (1995). The IL-3, GM-CSF, IL-5 receptor family. In Mertelsmann, R., and Herrmann, F. (ed.): *Hematopoietic growth factors in clinical applications*. Second Edition. Marcel Dekker. New York. pp 1.
- Harrison, D., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (1991). Involvement of a metalloprotease in spontaneous and phorbol ester-induced natural killer cell-associated Fc $\gamma$ RIII (CD16). *J Immunol* 147: 3459.
- Hartnell, A., Kay, A.B., and Wardlaw, A.J. (1992). IFN- $\gamma$  induces expression of Fc $\gamma$ RIII (CD16) on human eosinophils. *J Immunol* 148: 1471.
- Haskill, S., Martin, M., VanLe, L., Morris, J., Peace, A., Bigler, C.F., Jaffe, G.J., Sporn, S.A., Fong, S., Arend, W.F., and Ralph, P. (1991). cDNA cloning of a novel form of the interleukin-1 receptor antagonist associated with epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3681.
- hematopoiesis.
- Henkart, P.A. (1985). Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 3: 31.
- Henricson, H.F., Nete, R., and Vogel, S.N. (1991). An interleukin-1 receptor antagonist blocks lipopolysaccharide-induced colony stimulating factor production and early endotoxin tolerance. *Infect Immun* 59: 1188.
- Herrmann, F., Oster, W., Meuer, S.C., Klein, K., Lindemann, A., Mertelsmann, R. (1988). Interleukin-1 stimulates T lymphocytes to produce GM-CSF. *J Clin Invest* 81: 1415.
- Hibbs, M.L., Hogarth, P.M., and McKenzie, I.F.C. (1985). The mouse Ly17 locus identifies a polymorphism of the Fc receptor. *Immunogenetics* 22: 335.
- Hibbs, M.L., Sevaraj, P., Carpen, O., Springer, T. A., Kuster, H., Jouvin, M.H., and Kinet, J.P. (1989). Mechanisms for regulating expression of membrane isoforms of Fc $\gamma$ RIII (CD16). *Science* 246: 1608-1611.
- Hogarth, P.M., Wilcox, E., Hulett, M.D., Bournerot, C., Ewen, J., Fridman, W.H., and McKenzie, I.F.C. (1991). Structure of the mouse  $\beta$ Fc $\gamma$  receptor II gene. *J Immunol* 146: 369.
- Holtmann, H., and Wallach, D. (1987). Down regulation of the receptors for tumor necrosis factor by interleukin 1 and 4 beta-phorbol-12-myristate-13-acetate. *J Immunol* 139: 1161.
- Howard, M., and O'Garra, A. (1992). Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today* 13: 198.
- Huang, S., and Terstappen, L.W.M.M. (1992). Formation of hematopoietic microenvironment and hematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* 360: 745.
- Huizinga, T.W.J., Dolman, K.M., van der Linden, N.J.M., Kleijer, M., Nuijens, J.H., Kr. Von dem Borne, A.G., and Roos, D. (1990). Neoptilindiololol-linked Fc $\gamma$ RIII mediates eosinophils exocytosis of neutral granule contents but does not mediate initiation of the respiratory burst. *J Immunol* 144: 1432.
- Huizinga, T.W.J., Kerst, M., Nuijens, J.H., Vluc, A., Kr. von dem Borne, A.E.G., Roos, D., and Tetteroo, P.A.T. (1989). Binding characteristics of dimeric IgG subclasses complexes to human neutrophils. *J Immunol* 142: 2359.

- Huizinga, T.W.J., van der Schoot, C.F., Joost, C., Klussens, R., Kleijer, M., van der Borne, A.E.G.K., Roos, D., and Tetteroo, P.A.T. (1988). The FcR III linked receptor FcR III is released on stimulation of neutrophils. *Nature*. 333: 667.
- Hulett, M.D., and Hoegarth, P.M. (1994). Molecular basis of Fc receptor function. *Adv Immunol*. 57: 1.
- Hulett, M.D., Osman, N., McKenzie, I. F. C., and Hoegarth, P.M. (1991). Chimeric Fc receptors identify functional domains of the murine FcγRII high affinity receptor for IgG. *J Immunol*. 147: 1863.
- Ichikawa, Y. (1969). Differentiation of a cell line of myeloid leukemia. *J Cell Physiol*. 74: 223.
- Jerino, F. L., Hulett, M. D., McKenzie, I. F. C., and Hoegarth, P. M. (1993). Human FcγRII monoclonal antibodies define structural domains. *J Immunol*. 150: 1794.
- Jerino, F. L., Howell, M. S., McKenzie, I. F. C., and Hoegarth, P. M. (1994). Recombinant soluble human FcγRII: Production, characterization and inhibition of the Arthus reaction. *J Exp Med* 178: 1617.
- Indik, Z. K., Hunter, S., Huang, M.M., Pan, X.Q., Chien, P., Kelly, C., Levinson, A.L., Kimberly, R.P., Schreiber, A.D. (1994). The high affinity Fcγ receptor (CD64) induces phagocytosis in the absence of its cytoplasmic domain: the role of FcγRIIA in murine phagocytic function to FcγRI. *Exp Hematol*. 22: 599.
- Iwashima, M., Irving, B.A., van Oers, N.S.C., Chan, A.C., and Weiss, A. (1994). Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science*. 263: 1136.
- Jacobson, S.F.W., Ruscelli, F.W., Okkenhug, C., Lien, E., Ortiz, M., Veiby, O.P., and Keller, J.R. (1994a). Distinct and direct synergistic effects of IL-1 and IL-6 on proliferation and differentiation of primitive murine hematopoietic progenitor cells in vitro. *Exp Hematol*. 23: 217.
- Jacobson, S.F.W., Ruscelli, F.W., Ortiz, M., Gooya, J.M., and Keller, J.R. (1994b). The growth response of Lin-Thy+ hematopoietic progenitors to cytokines is determined by the balance between synergy of multiple stimulators and negative cooperation of multiple inhibitors. *Exp Hematol*. 22: 985.
- Johnson, C.S., Kockler, D.J., Topper, M.I., Braunschweiger, P.G., and Furtanowski, P. (1989). In vivo hemopoietic effects of recombinant interleukin-1 alpha in mice: stimulation of granulocytic, monocytic, megakaryocytic and early erythroid, suppression of late-stage erythropoiesis, and reversal of erythroid suppression with erythropoietin. *Blood*. 73: 678.
- Kakkis, E., Riggs K.J., Gillespie, W., and Calame K. (1989). A transcriptional repressor of c-myc. *Nature*. 339: 718.
- Kampschmidt, R.F. (1981). Leukocytic endogenous mediator/endogenous pyrogen, in Powanda, Canonico (ed). Physiologic and metabolic responses of the host. Amsterdam, Elsevier/NLland, pp 55-74.
- Kanakura, Y., Drusker, B., Cannistrò, S.A., Furukawa, Y., Torimoto, Y., Griffin, J.D. (1990). Signal transduction of the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-3 receptors involves tyrosine phosphorylation of a common set of cytoplasmic proteins. *Blood*. 76: 706.
- Kasper, R.L., and Oelke, L. (1994). Peripheral blood mononuclear cells stimulated with CSu or lipopolysaccharide to synthesize equivalent levels of IL-1β mRNA avoid unequal IL-1 β protein accumulation but similar polyribosome profiles. *J Immunol*. 153: 277.
- Kertz, J.M., van de Winkel, J.G.J., Evans, A.H., de Haas, M., Slaper-Cortenbach, I.C.M., de Wit, T.P.M., von dem Borne, A.E.G.K., van der Schoot, C.F., and Hoegarth, P.M. (1993). Granulocyte colony-stimulating factor induces hFcγRI (CD64 antigen)-positive neutrophils via an effect on myeloid precursor cells. *Blood*. 81: 1457.
- Kimura, A. (1993). Chronic lymphocytic leukemia associated with bone marrow fibrosis: possible role of interleukin 1 in the pathogenesis. *Am J Hematol*. 43: 47.
- Kishimoto, T., Taga, T., Akira, S. (1994). Cytokine signal transduction. *Cell*. 76: 253.
- Klaussner, R.D. (1989). Sorting and traffic in the central vacuolar system. *Cell*. 57: 703.
- Knaepf, W.H., Hassencamp, G., Chau, K.M., Fried, W. (1994). Immunoglobulin mediated aplastic anemia in mice: evidence of hematopoietic stromal injury and injury to hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 22: 573.
- Kobayashi, Y., Matsushima, K., and Oppenheim, J.J. (1989). Differential gene expression, synthesis, processing and release of interleukin-1α and interleukin-1β. In Dornford and Henderson (ed.), Interleukin-1, inflammation and disease. Elsevier, New York, pp. 47-62.
- Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M.F., Ellis, C., Pawson, T. (1991). SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*. 252: 669.
- Koch, K.C., Ye, K., Clark, B.D., and Dinarello, C.A. (1992). Interleukin 4 (IL-4) up-regulates gene and surface IL-1 receptor type II in murine T helper type 2 cells. *Eur J Immunol*. 22: 153.
- Konase, M., May, L.T., Tamim, I., Vitcek, J., and Sehgal, P.B. (1987). A cytokine network in human diploid fibroblasts: interactions of β interferon, tumor necrosis factor, platelet-derived growth factor and interleukin 1. *Mol Cell Biol*. 7: 273.
- Kolomnik, R., Ziegler, D.W. (1994). The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell*. 77: 325.
- Konatsu, N., Adamson, J.W., Altschuler, D., Torti, D., Marzocchini, R., Lapetina, E.G. (1992). Erythropoietin rapidly induces tyrosine phosphorylation in the human erythropoietin-dependent cell line, UT-7. *Blood*. 80: 53.
- Kovacs, E.J., Oppenheim, J.J., Carter, D.B., Young, J.A. (1987). Enhanced interleukin-1 production by human monocyte cell lines following treatment with 5-azacytidine. *J Leukocyte Biol*. 41: 40.
- Krane, S.M., Conca, W., Stephenson, M.L., Amadio, E.P., and Goldring, M.B. (1990). Mechanisms of matrix degradation in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci USA*. 580: 340.

- Krane, S.M., Dayer, J.M., Simon, L.S., et al (1985). Mononuclear cell-conditioned medium containing mononuclear cells (MCM): homologous with interleukin-1, stimulates collagen and fibronectin synthesis by adherent rheumatoid synovial cells: effects of prostaglandin E<sub>2</sub> and indomethacin. *Collagen Relat Res.* 5: 99.
- Krutmann, J., Kimbauer, R., Kock, A., Schwarz, T., Schopp, E., May, L.T., Sehgal, P.B., and Luger, T.A. (1990). Crosslinking Fc receptors on monocytes triggers IL-6 production. *J Immunol.* 145: 1337.
- Kryatosch, A., and Sachs, L. (1976). Control of lysozyme induction in the differentiation of myeloid leukemic cells. *Cell.* 9: 675.
- Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S.S., Flavell, R.A. (1995). Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Science* 267: 2000.
- Kurosaki, T., and Weis, T.V. (1989). A single amino acid in the GPI attachment domain determines the membrane topology of Fc $\gamma$ RIII. *Nature.* 342: 805.
- Kuster, J.M., Schauer, R. (1981). Phagocytosis of sialidase-treated rat erythrocytes: evidence for a two-step mechanism. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem.* 362: 1507.
- Lalberge, S., Grzeschinski, W.W., Boer, D.J., and Center, D.M. (1996). Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8<sup>+</sup> cells in vitro. *J Immunol.* 156: 310.
- Lamour, A., Smith, M.D., Ilyard, P.M., and Youinou, P.Y. (1995). The majority of Fc $\gamma$ RII-positive  $\gamma\delta$  T cells do not express IIIA-DR in patients with primary Sjogren's syndrome. *Immunol Lett.* 45: 153.
- Lanier, L.L., Currie, S., Yu, G., Testi, R., and Phillips, J.H. (1989). Membrane anchoring of human IgG Fc receptor (CD16) determined by a single amino acid. *Science.* 246:1611.
- Lanier, L.L., Rutenberg, J.J., and Phillips J.H. (1988). Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J Immunol.* 141: 3478.
- Landsdorf, P.M. (1995). Developmental changes in the function of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 23: 187.
- LeBoeuf, R.D., Carr, D.J.J., Green, M.M., Dhalock, J.E. (1990). Cellular effects of suppression, a biological response modifier of cells of the immune systems. *Prog Neuroendocrin Immunol.* 3: 176.
- LeMay, L.G., Oltmanns, I.G., Vassler, A.J., and Kluger, M.J. (1990). In vivo evidence that the rise in plasma IL-6 following injection of a fever-inducing dose of LPS is mediated by IL-1 beta. *Cytokine.* 2: 199.
- Lev, S., Givol, D., Yarden, Y. (1991). A specific combination of substrates is involved in signal transduction by the kit-encoded receptor. *EMBO J.* 10: 647.
- Liao, G., and Simon, S.R. (1994). Temporal down-regulation of Fc $\gamma$ RIII expression and Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis in murine L-derived macrophages induced by TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . *J Leukoc Biol.* 55: 702.
- Libby, P., Warner, S.J., and Friedman, G.B. (1988). Interleukin 1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanooids. *J Clin Invest.* 81: 487.
- Liewveld, J.L., Abboud, C.N., Looney, R.J., Ryan, D.H., and Brennan, J.K. (1988). Expression of IgG1 Fc receptors in myeloid leukemic cells. Effect of colony-stimulating factors and cytokines. *J Immunol.* 140: 1527.
- Linsekun, D., Park, L.S., Farrar, W.J. (1992). Dissociation of human cytokine receptor expression and signal transduction. *Blood.* 80: 1896.
- Liu, P.J., Chu, C.W., Koch, G.A., et al (1987). Development and use of a radioimmunoassay for human interleukin-1 beta. *Lymphokine Res.* 6: 229.
- Liu, J., Mathias, S., Yang, Z., and Kolesnick, R.N. (1994). Renaturation and tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulation of a 97-kDa ceramide activated protein kinase. *J Biol Chem.* 268: 3047.
- Lomedico, P.T., Gubler, R., Hellmann, C.P., Dinkovitch, M., Giri, J.G., Pau, Y.E., Collier, K., Semionow, R., Chua, A.O., and Mizel, S.B. (1984). Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in *Escherichia coli*. *Nature.* 312: 458.
- Lonnemann, G., Shapiro, L., Engler-Blum, G., Muller, G.A., Koch, K.M., and Dinarello, C.A. (1995). Cytokines in human renal interstitial fibrosis. I. Interleukin-1 is an autocrine growth factor for cultured fibrosis-derived kidney fibroblasts. *Kidney Int.* 47: 845.
- Lopez, A. F., Battye, F. L., and Vadas, M. A. (1985). Fc receptors on mouse neutrophils and eosinophils: Antigenic characteristic, isotype specificity and relative cell membrane density measured by flow cytometry. *Immunology.* 55: 125-133.
- Losem, J., Sachs, L. (1986). Regulation of cell surface receptor for different hematopoietic growth factor on myeloid leukemic cells. *EMBO J.* 5: 2163.
- Lovett, D., Kozan, B., Hadam, M., Resch, K., and Gensu, D. (1986). Macrophage cytotoxicity: interleukin 1 is a mediator of tumor cytotoxicity. *J Immunol.* 136: 340.
- Lowry, P.A., and Quisenberry, P.J. (1992). Overview of haematopoiesis. In Symann, M., Quisenberry, P.J., Morstyn, O. (ed.) *Haematopoietic growth factors: from the basic to clinical applications.* Gardiner-Caldwell, United Kingdom, pp 9-15.
- Lu, C.Y., Calami, E.G., Unanue, E.R. (1970). A defect in the antigen presenting function of macrophage from neonatal mice. *Nature.* 28: 327.
- Luttkien, C., Weggenk, U.M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemnicki, A., Harpur, A.G., Wilks, A.F., Yasukawa, K., Taga, T., Kishimoto, T., Barbieri, O., Pellegrini, S., Sendtner, S., Heinrich, P.C., and Horn, F. (1994). Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak 1 with the interleukin-6 signal transducer gp 130. *Science.* 263: 89.

- Meier, J.A.M., Voulalas, P., Roeder, D., and Macing, T. (1990). Extension of the life span of human endothelial cells by an interleukin-1 $\alpha$  antisense oligonucleotide. *Science*, 249: 1570.
- Mantzoris, B. X., Berger, M. F., Sewell, W., and Zola, H. (1993). Expression of the Fc receptor for IgG (Fc $\gamma$ RII/CD32) by human circulating T and B lymphocytes. *J Immunol*, 150: 5175.
- March, C.J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D.P., Braedt, G., Price, V., Ghilisi, S., Henney, C.S., Kronheim, S. R., Grabstein, K., Conlon, P. J., Hopp, T.P., and Cosman, D. (1985). Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 315: 641.
- Mathias, S., Younes, A., Kani, C.C., Orlov, Y., Joseph, C., and Kolenick, R.N. (1993). Activation of the sphingomyelin signaling pathway in intact EL4 cells and in a cell-free system by IL-1 $\beta$ . *Science*, 259: 519.
- Mayumi, H., Little, M.T., Dragasova, W., Thornbury, G., Lansford, P.M. (1995). Differential effects of the hemostatic inhibitors MIP-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ , and TNF- $\alpha$  on cytokine-induced proliferation of subpopulations of CD34+ cells purified from cord blood and fetal liver. *Exp Hematol*, 23: 422.
- McKean, D.J., Huntoon, C., Bell, M. (1994). Ligand-induced desensitization of interleukin 1 receptor-initiated intracellular signaling events in T helper lymphocytes. *J Exp Med*, 180: 1321.
- McKean, D.J., Nilsson, A., Beck, B.N., Giri, J., Mizel, S.B., and Handwerker, B.S. (1985). The role of IL-1 in the antigen-specific activation of murine class II-restricted T lymphocyte clones. *J Immunol*, 135: 3205.
- McKean, D.J., Podzorski, J.P., Bell, M.P., Nilsson, A., E., Huntoon, C.J., Slack, J., Dower, S.K., Sims, J. (1993). Murine T helper cell-2 lymphocytes express type I and type II IL-1 receptors, but only the type I receptor mediates costimulatory activity. *J Immunol*, 151: 3500.
- McKenzie, S., Keller, M., Cassel, D., Schreiber, A., Schwartz, S., Surrey, S., and Rappaport, E. (1992). Human Fc $\gamma$ RIIA gene: Genomic sequence and transcription start sites. *Mol Immunol*, 29: 1165.
- McNolan, C.J., Slack, J.J., Mosley, D., Cosman, D., Lupton, S.D., Hranov, L.L., Grubin, C.F., Wignall, J.M., Jenkins, N.A., Brannan, C.I., Copelan, N.G., Huebner, K., Croce, C.M., Camuzzone, L.A., Benjamin, D., Dower, S., Spriggs, M.K., and Sims, J.E. (1991). A novel IL-1 receptor cloned from B cells by mammalian expression is expressed in many cells types. *EMBO J*, 10: 2821.
- Mellman, I., Plautner, H., Steinman, R. M., Unkeles, J. C., and Cohn, Z. A. (1983). Internalization and degradation of macrophage Fc receptors during receptor-mediated phagocytosis. *J Cell Biol*, 96: 887.
- Mellman, I., and Unkeles, J. C. (1980). Purification of a functional Fc receptor through the use of a monoclonal antibody. *J Exp Med*, 152: 1048.
- Mellman, I., Koch, T., Healey, G., Hunziker, W., Lewis, V., Plautner, H., Miettinen, H., Vaux, D., Moore, K., Stuart, S. (1988). Structure and function of Fc receptors on macrophages and lymphocytes. *J Cell Sci*, Suppl 9: 45.
- Meltzer, M.S. (1981). Peritoneal mononuclear phagocytes from small animals. In Adams, D.O., Edelson, P.J., Koren, K. Methods for studying mononuclear phagocytes. Academic Press, New York, pp 63-67.
- Mendel, D.B., Chen, L., and Guyre, P.M. (1988). The effect of tumor necrosis factor on three IgG Fc receptors of human neutrophils. *Blood*, 71: 35-46.
- Mendoza, J.F., Caceres, J.R., Santiago, E., Mora, L.M., Sanchez, L., Corona, T. M., Machuca, C., Zambrano, J.R., Martinez, R.D., and Weiss-Steider, B. (1990). Evidence that G-CSF is a fibroblast growth factor that induces granulocytes to increase phagocytic and to present a mature morphology, and that macrophage secrete 45-kd molecules with these activities as well as with G-CSF-like activity. *Exp Hematol*, 18: 903.
- Metcalf, D. (1989). The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in hematopoietic cells. *Nature*, 339: 27.
- Metcalf, D. (1993). Hematopoietic Regulators: Redundancy or subtlety? *Blood*, 82: 3515.
- Metcalf, D., and Moore, M.A.S. (1971). Haemopoietic cells. *Frontiers of Biology*, Vol. 24. North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Metcalf, M., and Burgess, A.W. (1982). Clonal analysis of progenitor cell commitment to granulocyte or macrophage production. *J Cell Physiol*, 111: 275.
- Mitschke, Y., Uehara, H., Nagata, K. (1990). Induction of tumor necrosis factor- $\alpha$  and its receptors during differentiation in myeloid leukemic cells along the monocytic pathway. *J Biol Chem*, 265: 8751.
- Minami, A., Fujimoto, K., Ozaki, Y., Nakamura, S. (1988). Augmentation of host resistance to microbial infections by recombinant human interleukin-1 $\alpha$ . *Infect Immunol*, 56: 3116.
- Miyata, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartweg, E.A., and Yuan, J. (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 $\beta$  beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell*, 75: 653.
- Mochizuki, D. Y., Eisenman, J.R., Conlon, P.J., et al (1987). Interleukin-1 regulates hematopoietic activity, a role previously ascribed to hemopoietin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 5267.
- Moeszli, J., Al-Osman, F., Murphy, M.J.Jr. (1986). Rapid method for permanent slide preparation of colonies in soft agar cultures. *Int J Cell Cloning*, 4: 368.
- Moldavew, L.L., Anderson, C., Gelin, J., and Lundholm, K.O. (1988). Regulation of food intake and hepatic protein synthesis by recombinant derived cytokines. *Am J Physiol*, 254: G450.
- Moller, E. (1965). Contact-induced cytotoxicity by lymphoid cells containing foreign isoantigen. *Science*, 147: 873.
- Monroy, A.A. (1983). Activación de precursores mieloides para la producción de macrófagos y granulocitos peritoneales y la formación de receptores Fc a fin de determinar el mecanismo de inducción de ambos procesos. Tesis de Licenciatura (Biología), Escuela Nacional de Estudios Profesionales-Zaragoza, UNAM.

- Mora, M., Carinci, V., Bensi, G., Raugi, G., Buonamassa, D.T. and Melli, M. (1990). Differential expression of the human IL-1 alpha and beta genes. *Prog Clin Biol Res.* 349: 205.
- Mora, M.L., Santiago, R., Montesinos, J.J., and Weisa-Steider B. (1992). Hypothesis: The target cell of GM-CSF is a macrophage precursor capable to produce cells with the property to secrete a G-CSF like activity. *Eur Cytokine New.* 3: 337.
- Morrison, S.J., Uchida, N., Weissman, I.L. (1995) The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11: 35.
- Muegge, K., Vils, M., Gusella, G.L., Musso, T., Herrlich, P., Stein, B., and Durum, S.K. (1993). IL-1 induction of the c-jun promoter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 7054.
- Murai, M., Aramaki, Y., and Tsuchiya, S. (1995). Contribution of mannose receptor to signal transduction in Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis of mouse peritoneal macrophage induced by liposomes. *J Leukoc Biol.* 57: 687.
- Muta, T., Kurotaki, T., Misulovin, Z., Sanchez, M., Nussenzweig, M.C., and Rayeche, J.V. (1993). A 13 amino acid motif in the cytoplasmic domain of Fc $\gamma$ RII modulates B-cell receptor signaling. *Nature.* 368: 70.
- Nakamura, S., Nakata, K., Kashimoto, S., Yoshida, H., Yamada, M. (1986). Antitumor effects of recombinant human interleukin 1 alpha against murine syngenic tumors. *Jpn J Cancer Res.* 77: 707.
- Nathan, C.F. (1989). Respiratory burst in adherent human neutrophils: triggering by GM-CSF and G-CSF. *Blood.* 73: 301.
- Nerutkar, I.S. (1981). *Lysosome*. in Adams, D.O., Edelson, P.J., Koren, K. Methods for studying mononuclear phagocytes. Academic Press. New York. pp 667-683.
- Nicola, N.A. (1989). Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Annu Rev Biochem.* 58: 45.
- Nicola, N.A., Metcalf, D. (1991). Subunit transitivity among hemopoietic growth factor receptors. *Cell.* 67: 1.
- Nishikomori, R., Kawai, M., Jung, E.Y., Toi, G., Miyajima, A., Arai, N., Mayumi, M., and Heike, T. (1995). c-kit DNA elements of mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene responsive to Fc $\gamma$  receptor cross-linking stimulation in the mouse mast cell line MC9J. *J Immunol.* 154: 694.
- O'Neill, L.A.J., Bird, T.A., and Saklatvala, J. (1990). Interleukin-1 signal transduction. *Immunol Today.* 11: 392.
- Oetting, H.C., Martin, T.R., Wynshaw-Boris, A., Deng, C., Drenth, J.M., and Lerner, P. (1994). Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature.* 370: 367.
- Ogawa, M. (1993) Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood.* 81: 2844.
- Ogawa, M., Mizusaki, Y., Nishikawa, S., Hayashi, S.I., Kuwada, T., Sudo, T., Kim, T., Nakauchi, H., Nishikawa, S.I. (1991). Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med.* 174: 63.
- Ohno, H.I., Aoe, T., Ra, C., Yamamoto, T., and Saito, T. (1993). TCR isoform containing the Fc $\epsilon$  receptor chain exhibit structural and functional differences from isoform containing CD3 $\zeta$ . *Int Immunol.* 5: 1403.
- Ohno, H., Ono, S., Hirayama, N., Shimoda, S., and Saito, T. (1994). Preferential usage of the Fc $\epsilon$  receptor  $\gamma$  chain in the T cell antigen receptor complex by  $\gamma\delta$  T cells localized in epithelia. *J Exp Med.* 179: 365.
- Okusawa, S., Gelfand, J.A., Ikejima, T., Connolly, R.J., and Dinarello, C.A. (1988). Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest.* 81: 1162.
- Onozaki, K., Urawa, H., Tamatani, T., Iwamura, Y., Hashimoto, T., Iba, T., Suzuki, H., Yamada, M., Yamamoto, S., Oppenheim, J.J., and Matsushima, K. (1988). Synergistic interaction of interleukin 1, interferon- $\beta$ , and tumor necrosis factor in terminally differentiating a mouse myeloid leukemic cell line (M1). *J Immunol.* 140: 112.
- Onozaki, K., Matsushima, K., Aggarwal, D.B., and Oppenheim, J.J. (1985). Human interleukin 1 is a cytotoxic factor for several tumor cell lines. *J Immunol.* 135: 3962.
- Onozaki, K., Tamatani, T., Hashimoto, T., Matsushima, K. (1987). Growth inhibition and augmentation of mouse myeloid leukemic cell line differentiation by interleukin 1. *Cancer Res.* 47: 2397.
- Orric, D., and Bodine, D.M. (1994) What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): Will the real PHSC please stand up! *Blood.* 84: 39.
- Orloff, D.G., Ra, C., Frank, S.J., Klausner, R.D., and Kinz, J.P. (1990). The  $\zeta$  and  $\eta$  of the T cell receptors and the  $\gamma$  chain of Fc receptors form a family of disulfide-linked dimers. *Nature.* 347: 189.
- Otsun, N., Kozak, C.A., McKenric, I.F.C., and Hogarth, P.M. (1992). Structure and mapping of the gene encoding the mouse high affinity Fc $\gamma$ RI gene and chromosomal location of the human Fc $\gamma$ RI gene. *J Immunol.* 148: 1570.
- Oswald, I.P., Gazzinelli, R.T., Sher, A., James, S.L. (1992) IL-10 synergizes with IL-1 and transforming growth factor- $\beta$  to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J Immunol.* 148: 1853.
- Ozaki, Y., Ohashi, T., Minami, A., Nakamura, S. (1987) Enhanced resistance of mice to bacterial infection induced by recombinant human interleukin-1 $\alpha$ . *Infect Immunol.* 56: 3116.
- Prolini, K., Renard, V., Vivier, E., Oerni, K., Jouvin, M.W., Malissen, H., and Kinet, J.P. (1995). Different roles for the Fc $\gamma$  receptors in a function of receptor context. *J Exp Med.* 181: 247.
- Pasalic, B., Flieger, D., and Ziegler-Heitbrock, H.W.L. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* 74: 2527.
- Peltz, G.A., Frederick, K., Anderson, C. L., and Peterlin, B. M. (1988). Characterization of the human monocyte high affinity Fc $\epsilon$  receptor (huFc $\epsilon$ RI). *Mol Immunol.* 25: 243.

- Peltz, G.A., Grundy, H.O., Labo, R.V., Yssel, H., Barsh, G.S., and Moore, K.W. (1989). Human FcγRIII, cloning, expression, and identification of the chromosomal location of two Fc receptors for IgG. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86: 1013.
- Perlmutter, D.H., and Colten, H.R. (1986). Molecular immunology of complement biosynthesis: a model for genetic control of effector-inhibitor balance. *Annu Rev Immunol*. 4: 231.
- Perussia, B., and Ravetch, J.V. (1991). FcγRIII (CD16) on human macrophages is a functional product of the FcγRIII-2 gene. *Eur J Immunol*. 21: 425.
- Perussia, B., Deacon, E.T., Lazarus, R., Fanning, V., and Trinchieri, G. (1993). Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocyte and myeloid cells. *J Exp Med*. 158: 1092.
- Pfefferkorn, L. C., and Fanger, M. W. (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.
- Phillips, M. D., and Tucker, D. C. (1983). Fe-dependent inhibition of mouse B cell activation by whole anti- $\alpha$  antibodies. *J Immunol*. 130: 602.
- Plutnick, D.H., and Sachs, L. (1965). The cloning of normal mast cells in tissue culture. *J Cell Comp Physiol*. 66: 319.
- Porces, A. J., Redecha, P. H., Doebele, R., Pan, L. C., Salmon, J. E., and Kimberly, R. P. (1992). Novel Fcγ receptor I family gene products in human mononuclear cells. *J Clin Invest*. 90: 2101.
- Qiu, W. Q., De Hruin, D., Brownstein, B. H., Pearce, R., and Ravetch, J. V. (1990). Organization of human and mouse low-affinity FcγR genes: Duplication and recombination. *Science*. 248: 732-735.
- Quilliam, A. L., Osman, N., McKenzie, I. F. C., and Hogarth, P. M. (1993). Biochemical characterization of murine FcγRI. *Immunology*. 78: 358.
- Radford, J., Testa, N.G., Crowther, D. (1990). The long-term effect of MVPP chemotherapy for Hodgkin's disease on bone marrow function. *Br J Cancer*. 62: 127.
- Ramadoni, G., Sipe, J.D., Dinarello, C.A., et al (1985). Pretranslational modulation of acute phase hepatic protein synthesis by murine recombinant interleukin-1 and purified human IL-1. *J Exp Med*. 162: 930.
- Ravetch, J. V., and Anderson, C. L. (1990). FcγR family: Proteins, transcripts and genes. In Metzger, H. Fc receptors and the action of antibodies. *Am Soc Microbiol*. Washington. pp 211-235.
- Ravetch, J.R. (1994). Fc receptors: Kuhn redux. *Cell*. 78: 553.
- Ravetch, J.V., Luster, A.D., Weinstanek, J.K., Kocian, J., Pavlovic, A., Portnoy, D.A., Holmes, J., Pan, Y.C. E., and Unkeless, J. C. (1986). Structural heterogeneity and functional domains of murine immunoglobulin G Fc receptors. *Science*. 234: 718.
- Re, F., Mutz, M., De Rossi, M., Polentarutti, N., Giri, J.G., Mantovani, A., Colotta, F. (1994). The type II "receptor" as a desensitizer for interleukin 1 in polymorphonuclear leukocytes: characterization of induction by dexamethasone and ligand binding properties of the released decoy receptor. *J Exp Med* 179: 739.
- Repp, R., Valerius, Th., Sandler, A., Gramatzki, M., Iro, H., Kalden, J.R., and Platzer, E. (1991). Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (FcγRI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 78: 885.
- Repp, R., Valcrius, T., Sandler, A., Gramatzki, M., Iro, H., Kalden, J. R., and Platzer, E. (1991). Neutrophils express the high-affinity receptor for IgG (FcγRI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 78: 885.
- Roberts, A.D., Blood, N.S., Winkler, T.S., Burnester, J.K., and Sponi, M.D. (1992). Role of transforming growth factor-β in maintenance of function of cultured neonatal cardiac myocytes: Autocrine action and reversal of damaging effects of interleukin-1. *J Clin Invest*. 90: 2056.
- Rodewald, H.R., Awad, K., Moingeon, P., D'Adamo, L., Rabinowitz, D., Shinkai, Y., Alt, F. W., and Reinherz, E. L. (1993). FcγRIII and CD2 expression mark distinct subpopulations of immature CD4-CD8-murine thymocytes: in vivo developmental kinetics and T cell receptor β chain rearrangement status. *J Exp Med*. 177: 1079.
- Rosnet, O., Schiff, C., Pebusque, M.L. (1993). Human FLT 3/FLK 2 gene. cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood*. 82: 1110.
- Rosoff, P.M., Savage, N., and Dinarello, C.A. (1988). Interleukin-1 stimulates diacylglycerol production in T lymphocytes by a novel mechanism. *Cell*. 54: 73.
- Rothenberg, E.V., Diamond, R.A., Pepper, K.A., and Yang, J.A. (1990). IL-2 gene inducibility in T cells before T cell receptor expression. Changes in signaling pathways and gene expression requirements during intrathymic maturation. *J Immunol*. 144: 1614.
- Rühl, S., and Plutnick D.H. (1993). Dissociation of early and late markers of murine myeloid differentiation by interferon-gamma and interleukin-6. *J Cell Physiol*. 155: 130.
- Sachs, L. (1978). Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukemia. *Nature*. 274: 345.
- Sachs, L. (1987a). Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukemia. *Nature*. 274: 335.
- Sachs, L. (1987b). The molecular control of blood cell development. *Science*. 238: 1374.
- Sachs, L., and Loken, J. (1989). The network of hematopoietic cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86: 206-210.
- Saklatvala, J., Sarsfield, S.J., Townsend, Y. (1985). P1g interleukin-1. Purification of two immunologically different leukocyte proteins that cause cartilage resorption, lymphocyte activation, and fever. *J Exp Med*. 162: 1208.

- Sandor, M., and Lynch, R. G. (1992). Lymphocyte Fc receptors: The special case of T cells. *Immunol Today* 14: 227-231.
- Sarmay, G., Rozsnyay, Z., Konec, G., and Gergely, J. (1995). Interaction of signaling molecules with human FcγRIIb1 and the role of various FcRII isoforms in B-cell regulation. *Immunol Lett.* 44: 125.
- Sarmay, G., Rozsnyay, Z., Szabo, I., Biro, A., and Gergely, J. (1991). Modulation of the type II Fcγ receptor expression on activated human B lymphocytes. *Eur J Immunol.* 21: 541.
- Scapigliati, G., Chiara, P., Bartalini, A., Taglibue, A., and Boraschi, D. (1989). Differential binding of IL-1α and IL-1β to receptors on B and T cells. *FEDS Lett.* 243: 394.
- Scott, E. W., Simon, M. S., Anastasi, J., Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU. 1 in the development of murine hematopoietic lineages. *Science*. 265: 1573.
- Schindler, R., Clark, B. D., and Dinarello, C. A. (1990a). Dissociation between interleukin-1β mRNA and protein synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem.* 265: 10232.
- Schindler, R., Ghezzi, Z., and Dinarello, C. A. (1990b). IL-1 induces IL-1 IV. IFN-γ suppresses IL-1 but not hypoxanthine-dependent transcription of IL-1. *J Immunol.* 144: 2216.
- Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S. C., and Dinarello, C. A. (1990c). Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*. 75: 40.
- Schmitt, D. A., Hianau, D., Hieber, T., Dexheimer-Dambuyser, C., Schmitt, D., Fabre, M., Pauty, G., and Cazenave, J. P. (1990). Human epidermal Langerhans cells express only the 40-kilodalton Fcγ receptor (FcγRII). *J Immunol.* 144: 4284.
- Schro, R., Coutinho, I. L., Testa, N. G., Dexter, T. M. (1989). Effect of exogenous growth factors on stromal cells from human LTBM. *Tissue Antigens Histocompatibility and Immunogenetics* 33: 229.
- Schnitz, S., Maclell, T., and Kronke, M. (1994). The role of diacylglycerol and ceramide in tumor necrosis factor and interleukin-1 signal transduction. *J Leukocyte Biol.* 56: 533.
- Sears, D. W., Osman, N., Tate, B., McKenzie, J. F. C., and Hogarth, P. M. (1990). Molecular cloning and expression of the mouse high affinity Fcγ receptor for IgG. *J Immunol.* 144: 371.
- Sedmak, D. H., Davis, I. H., Singh, U., van de Winkel, J. G. J., and Anderson, C. I. (1991). Distribution of IgG Fc receptor antigens in placenta and endothelial cells in man. An immunohistochemical study. *Am J Pathol.* 138: 175.
- Segal, D. M., and Snider, D. P. (1989). Targeting and activation of cytotoxic lymphocytes. *Chem Immunol.* 47: 179.
- Segal, D. M., and Wunderlich, J. R. (1988). Targeting of cytotoxic cells with heterocrosslinked antibodies. *Cancer Invest.* 6: 83-92.
- Segal, M. D. (1990). Antibody-mediated killing by leukocytes. In Metzger, H. Fc receptors and the action of antibodies. *Am Soc Microbiol.* Washington, pp 291-301.
- Selvaraj, P., Rosse, W. F., Silber, R., and Springer, T. A. (1988). The major Fcγ receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nature.* 333: 565.
- Shapiro, L., Zhang, X. K., Rupp, R. G., Wolf, S. M., and Dinarello, C. A. (1993). Ciliary neurotrophic factor is an endogenous pyrogen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 8614.
- Shaw, G., Kamen, R. (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46: 659.
- Shieh, J. L., Gordon, M. S., Peterson, R. H. F., Jakubowski, A. A., Gabrilove, J. L., and Moore, M. A. S. (1990). Modulation of cytokine receptor and superoxide production in neutrophils treated with IL-1 in vitro and in vivo. *Blood.* 76(suppl): 165.
- Shirkawa, F., Saito, K., Bonagura, C. A., Galson, D. L., Fenton, M. J., Webb, A. C., and Auron, P. E. (1993). The human prointerleukin 1β gene requires DNA sequences both proximal and distal to the transcription start site for tissue-specific induction. *Mol Cell Biol.* 13: 1332.
- Sieff, C. A. (1990). Biological and clinical aspects of the hematopoietic growth factors. *Annu Rev Med.* 41: 483.
- Simic, M. M., and Stosic-Grujicic, S. (1985). The dual role of interleukin 1 in lectin-induced proliferation of T cells. *Folia Biol.* 31: 410.
- Sirumun, D., and Seed, B. (1988). The Fcγ receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein. *Nature.* 333: 568.
- Simms, H. H., Garther, T. A., Fries, L. F., and Frank, M. M. (1991). Monokines released during short term Fcγ receptor phagocytosis up-regulate polymorphonuclear leukocytes and mono-phagocytosis function. *J Immunol.* 147: 265.
- Sims, J. E., Gayle, M. A., Slack, J. L., Alderson, M. R., Bird, T. A., Giri, J. O., Colotta, F., Re, F., Mantovani, A., Shanebeck, K., Grabstein, K. H., and Dowler, S. K. (1993). Interleukin-1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 6155.
- Sims, J. E., Giri, J. O., and Dowler, S. K. (1994). The two interleukin-1 receptors play different roles in I-1 activities. *Clin Immunol Immunopathol.* 72: 9.
- Sims, J. E., March, C. J., Cosman, D., Widmer, M. B., McDonald, H. R., McMahon, C. J., Grubin, C. E., Wignall, J. M., Call, S. M., Friend, D., Alpert, A. R., Gillis, S. R., Urdal, D. L., Dowler, S. K. (1988). cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science.* 241: 585.

- Sivo, J., Politis, A. D., and Vogel, S. N. (1993). Differential effects of interferon- $\gamma$  and glucocorticoids on Fc $\gamma$ R gene expression on murine macrophages. *J Leukoc Biol*, 54: 45.
- Slack, J., McMahan, C.J., Waugh, S., Schooley, K., Spriggs, M.K., Sims, J.E., and Dower, S.K. (1993). Independent binding of interleukin-1 $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$ , to type I and type II interleukin-1 receptors. *J Biol Chem* 268: 2413.
- Smith, J. W., Urba, W.J., Curti, B.D., Elwood, L.J., Steis, R.G., Jenik, J.E., Sharfman, W.H., Miller, L.L., Fanton, R.G., Conton, K.C., Rossio, J., Kopp, W., Shimazui, M., Oppenheim, J.J., and Longo, D. (1992a). The toxic and hemologic effects of interleukin-1 $\alpha$  administered in a phase I trial to patients with advanced malignancies. *Clin Oncol*, 10: 1141.
- Smith, M.F. Jr., Eildon, D., Brewer, M.T., Eisenberg, S.P., Arend, W.P., and Gutierrez-Hartmann, A. (1992b). Human IL-1 receptor antagonist promoter: Cell type-specific activity and identification of regulatory regions. *J Immunol*, 149: 2000.
- Somayaj, Z., Shelton, S. B., Chaudhuri, T., Gush, G., Pawson, T., Hasert, W., King, G., Roberts, T., Ratnoffsky, S., Lechneide, Neel, B.G., Birge, R.H., Fajardo, E., Chou, M., Hamausa, H., Schaffhausen, B., and Chantley, L. I. (1993). SH2 domains recognise specific phosphopeptide sequences. *Cell*, 72: 767.
- Souza, L.M., Boone, T. C., Gubrilove, J. (1986). Recombinant human granulocyte colony stimulating factor. Effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science*, 232: 61.
- Spriggs, M.K., Hruby, D.E., Maliszewski, C.R., Pickup, D.J., Sims, J.E., Buller, R.M., and VanStyke, J. (1992). Vaccinia and cowpox viruses encode a novel secreted interleukin-1 binding protein. *Cell*, 71: 145.
- Stahl, N., Boulton, T.G., Farruggella, T., Ip, N.Y., Davis, S., Withuhn, B.A., Quelle, F.W., Silverman, O., Barbieri, G., Pellegrini, S., Ilic, J.N., and Yancopoulos, G.D. (1994). Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-ILF-OSM-IL-6  $\beta$  receptor components. *Science*, 263: 92.
- Stahl, N., Yancopoulos, G.D. (1993). The alpha, beta, and gamma, and kinases of cytokine receptor complexes. *Cell*, 74: 587.
- Starobinas, N., Pereira, M., Summa, M.E.L., and Issac, L. (1994). Phagocytic activity mediated via Fc $\gamma$ R, Fc $\mu$ R, and CR3 and iH2O2 release during ontogeny of mouse macrophages. *Develop Comp Immunol*, 18:443-454.
- Stevenson, F.T., Hursten, S.L., Fanton, C., Locksley, R.M., and Lovett, D.H. (1993). The 13-KDa precursor of interleukin-1 $\alpha$  is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal portion. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7245.
- Stuart, S. G., Simister, N. E., Clarkson, S. B., Shapiro, M., and Mellman, I. (1989). The low affinity Fc receptor for human IgG (hFc $\gamma$ RII) exists as multiple isoforms in macrophages, lymphocytes and IgG-transporting placental epithelium. *EMBO J*, 8: 3657.
- Styllansou, E., O'Neill L.A.-J., Rawlinson, L., Edbrooke, M.R., Woo, P., and Saklatvala, J. (1992). Interleukin-1 induces NF $\kappa$ B through its type I but not its type II receptor in lymphocytes. *J Biol Chem*, 267: 15836.
- Sutherland, H.J., Lansford, P.M., Henkelman, D.H., Eaves, A.C., Eaves, C.J. (1990). Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 3584.
- Symons, J.A., Eastgate, J.A., and Duff, G.W. (1991). Purification and characterization of a novel soluble receptor for interleukin-1. *J Exp Med*, 174: 1251.
- Szilvassy, S.J., Fraser, C.C., Eaves, C.J., Lansford, P.M., Eaves, A.C., Humphries, R.K. (1989). Retrovirus-mediated gene transfer to purified hemopoietic stem cells with long term lymphohematopoietic repopulation ability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 8798.
- Taga, T., Kishimoto, T. (1992). Cytokine receptors and signal transduction. *FASEB J*, 6: 3387.
- Takizawa, F., Adamczewski, M., and Kinet, J.-P. (1992). Identification of the low affinity receptor for immunoglobulin E on mouse mast cells and macrophages as Fc $\gamma$ RII and Fc $\gamma$ RIII. *J Exp Med*, 176: 469.
- Tartour, E., de Salle, G., de la Salle, C., Teillac, C., Canon, L., Guizha, A., Latour, S., Housou, D., Fridman, W. F., and Sautes C. (1993). Identification, in mouse macrophages and in serum, of a soluble receptor for the Fc portion of IgG (Fc $\gamma$ R) encoded by an alternatively spliced transcript of the Fc $\gamma$ RII gene. *Int Immunol*, 5: 859.
- Te Velde, A. A., de waal Malefijt, R., Huijbens, R. J., de Vries, J. E., and Figdor, C. G. (1992). IL-10 stimulates monocyte Fc $\gamma$ R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10. *J Immunol*, 149: 4048.
- Te Velde, A. A., Huijbens, J. F., De Vries J. E., and Figdor, C. G. (1990). IL-4 decreases Fc $\gamma$ R membrane expression and Fc $\gamma$ R-mediated cytotoxic activity of human monocytes. *J Immunol*, 144: 3046.
- Telford, J.L., Macchiie, G., Massone, A., Carinci, V., Palli, E., Melli, M. (1986). The murine interleukin 1 beta gene: structure and evolution. *Nucleic Acids Res*, 14: 9955.
- Testa, N.G., Coutinho, L.H., Radford, J.A., and Will, A. (1993). Growth factors and the microenvironment. In van Furth, R. (ed): Hematopoietic growth factors and monoclonal phagocytes. Karger, Basel, Switzerland, pp 36-43.
- Testa, N.G., Hendry, J.H., Molinsky, G. (1988). Long-term bone marrow damage after cytotoxic treatment: stem cells and microenvironment. In Testa, N.G. (ed) Hematopoiesis: Long-term effects of chemotherapy and radiation. Marcel Dekker, New York, pp 75-91.
- Tewari, A., Buhles, W. C., Jr., and Starnes, H.F. Jr. (1990). Preliminary report: effects of interleukin-1 on platelet counts. *Lancet* 336: 712.



- Therberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molinsaus, S.M., Weidner, J.R., Amlins, J., Schmidt, J.A., and Tocci, M. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 $\beta$  processing in monocytes. *Nature*, 356: 768.
- Tilg, H., Trehu, E., Atkins, M.B., Dinarello, C.A., and Mier, J.W. (1994). Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood*, 83: 113.
- Till, J.E., and McCulloch, E.A. (1980). Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochim Biophys Acta*, 605: 431.
- Tocci, M.J., Hutchinson, N.J., Cameron, P.M., Kirk, K.E., Norman, D.J., Chiu, J., Rupp, E.A., Jimiwo, G.A., Bonilla-Arduino, V.M., Schmidt, J.A. (1987). Expression in *Escherichia coli* of fully active recombinant human IL-1 $\beta$ : comparison with native human IL-1. *J Immunol* 138: 1109.
- Torigoe, T., O'Connor, R., Reed, J.C. (1992b). Interleukin-3 regulates the activity of the LYN protein-tyrosine kinase in myeloid-committed leukemic cell lines. *Blood*, 80: 617.
- Torigoe, T., Saito, H.U., Reed, J.C. (1992a). Interleukin 2 regulates the activity of the *lyn* protein tyrosine kinase in a Bcell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 2674.
- Tracey, K. J., Fong, Y., Hesse, D.G., Manogue, K.R., Lee, A.T., Kuo, G.C., Lowry, S.F., and Cerami, A. (1987). Antichocetin/INF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteremia. *Nature* 330: 662.
- Trezzi, C., Jiang, T.W., Spycher, M. O., Maly, F. E., and Rao, P. (1990). Human monocyte CD36 and CD16 are signaling molecules. *Immunol*, 71: 29.
- Ulich, T.R., del Castillo, J., Keys, M., Granger, G.A., and Ni, R.X. (1987). Kinetics and mechanisms of recombinant human interleukin 1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  induced changes in circulating numbers of neutrophils and lymphocytes. *J Immunol*, 139: 3496.
- Ulvestad, E., Williams, K., Vedelet, C., Antel, J., Nyland, H., Mørk, S., and Matre, R. (1994) Reactive microglia in multiple sclerosis lesions have an increased expression of receptor for the Fc part of IgG. *J Neuro Sci* 121: 125.
- Unkeless, J. C. (1979). Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J Exp Med*, 150: 580.
- Unkeless, J. C., Kaplan, G., Plutner, H., and Cohn, Z. A. (1979). Fc-receptor variants of a mouse macrophage cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:1400.
- Unkeless, J. C., Scigliano, E., and Freedman, V. H. (1988). Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu Rev Immunol*, 6: 251.
- van de Winkel, J.G.J., and Capel, J.A. (1993). Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today*, 14: 215.
- Vance, B. A., Huzinga, T. W. J., and Guyre, P. M. (1992). Functional polymorphism of Fc $\gamma$ RIII on human LGL/NK cells. *FASEB J*, 6: 1620A.
- Wallace, P.K., Howell, A.L., and Fanger, M.W. (1994). Role of Fc $\gamma$  receptors in cancer and infectious disease. *J Leukoc Biol*, 55: 816.
- Welsh, A.C., Collins, K. L., Auron, P.E., Eddy, R.L., Nakai, H., Byers, M.G., Insley, L.L., Herzy, W.M., and Shows, T.B. (1986). Interleukin-1 gene (IL-1) assigned to long arm of human chromosome 2. *Lymphokine Res* 5: 77.
- Weinshank, R. L., Luster, A. D., and Ravetch, J. V. (1988). Function and regulation of a murine macrophage specific IgG Fc receptor, Fc $\gamma$ RI. *J Exp Med*, 167: 1909.
- Weiss, A., and Littman, D. R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*, 76: 263-274.
- Welch, G. R., Moran, H. L., and Wachs, S. M. (1990). Selective induction of Fc $\gamma$ RIII on human monocytes by transforming growth factor- $\beta$ . *J Immunol*, 144: 3444.
- Wilson, K.P., Black, J.A., Thomson, J.A., Kim, E.E., Griffith, J.P., Navia, M.A., Murcko, M.A., Chambers, S.P., Aldape, R.A., Raybuck, S.A., and Livingston, D.J. (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Nature*, 370: 270.
- Williams, D.E. and Morrissey, P.J. (1989). Alterations in megakaryocyte and platelet compartments following *in vivo* IL-1 $\beta$  administration to normal mice. *J Immunol*, 142: 4361.
- Wirthmueller, U., Kurosaki, T., Murakami, M.S., and Ravetch, J.V. (1992). Signal transduction by Fc $\gamma$ RII is mediated through the  $\gamma$  chain. *J Exp Med*, 175: 1381.
- Ye, K., Dinarello, C.A., and Clark, B.D. (1993). Identification of the promoter region of the human interleukin 1 type I receptor gene: multiple initiation sites, high G+C content, and constitutive expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 2295.
- Ye, K., Koch, K.C., Clark, B.D., and Dinarello, C.A. (1992). Interleukin-1 down regulates gene and surface expression of interleukin-1 receptor type I by destabilizing its mRNA whereas interleukin-2 increases its expression. *Immunology*, 75: 427.
- Yoshida, Y. (1994). Overview of the hematopoietic growth factor and cytokines past, present and future. *International J Hematol* 60: 177.
- Zaslav, K.M., Iribenkovoff, V.N., Schiffer, S., Chang, D., McCall, E., Dinarello, C.A., Brown, M.A., Altrouk, B., and Bagby, G.C. Jr. (1988). Vascular endothelial cells and granulopoiesis: interleukin-1 stimulates release of G-CSF and GM-CSF. *Blood*, 71: 99.
- Zaslav, K., Wypych, J., McNiece, I.K., Lu, H.S., Smith, K.A., Karkare, S.B., Sachdev, R.K., Yuschenkov, V.N., Birckett, N.C., Williams, L.R., Satyagal, V.N., Tung, W., Bosseman, R.A., Mendhar, B.A., Langley K.E. (1990).

Identification, purification and biological characterization of hematopoietic stem cells factor from buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell*. 63: 195.

## SIGLAS DE USO MAS FRECUENTE EN LA TESIS

aa. Aminoácidos.  
Ab. Anticuerpo  
ADCC. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.  
Ag-Ab. Complejo antígeno-anticuerpo.  
Ag. Antígeno.  
*c-fms*. Receptor del M-CSF.  
CFC. Célula formadora de colonias.  
CFU-S. Unidad formadora de colonias del bazo.  
CR. Receptor de citocina.  
CSF. Factor estimulador de colonias.  
EPO. Eritropoyetina.  
FcγR. Receptor para la fracción cristalizable (Fc) de la inmunoglobulina G.  
FcγRI. Receptor Fcγ tipo I.  
FcγRII. Receptor Fcγ tipo II.  
FcγRIII. Receptor Fcγ tipo III.  
FcεRI. Inductor de receptores Fc.  
G-CSF. Factor estimulador de colonias de granulocitos.  
GM-CSF. Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos.  
h. Humano  
HGF. Factor de crecimiento hematopoyético.  
icIL-1Ra. IL-1Ra intracelular.  
IFNγ. Interferon gamma.  
IL-1α. Interleucina-1 alfa  
IL-1β. Interleucina-1 beta  
IL-1Ra. Antagonista del receptor de la IL-1.  
IL-1RI. Receptor de la IL-1 tipo I.  
IL-1RII. Receptor de la IL-1 tipo II.  
IL-2. Interleucina-2. (Existen IL's que van de la 1 a la 15).  
IL-6. Interleucina-6.  
LPS. Lipopolisacárido.  
M-CSF. Factor estimulador de colonias de macrófagos.  
m. Ratón  
Mac I. Macrófagos inducidos a la cavidad peritoneal de ratón.  
Mac R. Macrófagos residentes de cavidad peritoneal de ratón.  
MC. Medio condicionado.  
PDGF. Factor de crecimiento derivado de plaquetas.  
PGE2. Prostaglandina E2.  
PHSC. Célula tallo (seminal) hematopoyética pluripotencial.  
rh. Proteína recombinante humana  
rm. Proteína recombinante de ratón  
RTK. Receptor de tirosina cinasa.  
SCF. Factor de células tallo  
TGF. Factor de crecimiento transformante.  
TNF. Factor de necrosis tumoral.