

7



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

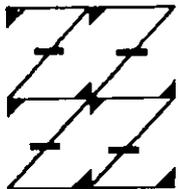
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

ANALISIS DE LAS PROTEINAS QUE PARTICIPAN EN LA
TRANSDUCCION DE SEÑALES A TRAVES DE LOS
RECEPTORES FcγRI y FcγRII EN CELULAS THP-1
INDIFERENCIADAS E INDUCIDAS A LA DIFERENCIACION

290994

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
VERONICA CEPEDA CORNEJO

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXIÓN

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ISABEL SOTO CRUZ

MEXICO, D. F.

ENERO 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores ZARAGOZA

**ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS QUE PARTICIPAN EN LA TRANSDUCCIÓN DE
SEÑALES A TRAVÉS DE LOS RECEPTORES FcγRI y FcγRII EN CÉLULAS THP-1
INDIFERENCIADAS E INDUCIDAS A LA DIFERENCIACIÓN**

Verónica Cepeda Cornejo.

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, Laboratorio de
Oncología.

Dir. de Tesis

Dra. Isabel Soto Cruz.

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Isabel Soto, por su apoyo y dedicación en la realización de esta tesis desde sus inicios. Por su ayuda en la pronta resolución a los problemas que se nos presentaron, por sus consejos y por el conocimiento que me compartió.

Agradezco también el apoyo financiero para la realización de esta tesis brindado por DGPA, proyecto IN204696, al Dr. Enrique Ortega y a Claudia Hallal; así como a la dirección general de Becas.

A mi madre por su ayuda y apoyo incondicionales, por su dedicación de toda una vida y por el afecto que me ha dado. A Manuel por creer que podía lograrlo y por la mano que me ha tendido, a mis hermanas por el ánimo que me dan. A Emilio por el gran cariño que siempre me ha demostrado.

Agradezco a los compañeros del laboratorio de Diferenciación Celular Cáncer, quienes en algún momento me brindaron su ayuda como Jorge H., Antonio A., Eduardo, Arturo y Lalo, a Gisella, Fernando, Ignacio. Muy especialmente a Carolina por ser una gran amiga y por los momentos que pasamos a lo largo de toda la carrera. Al Dr. Alberto Monroy quien me permitió utilizar su equipo de laboratorio. A Don José por su valiosa ayuda técnica.

Al DR. Benny Weiss S. por su dedicación en la corrección de esta tesis, así como al M. en C. Carlos Bautista y al Dr. Jorge Flavio M. Muy especialmente al Dr. Edelmiro Santiago O. por sus acertados comentarios para la mejora de este trabajo, a todos ellos les doy las gracias.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEORICO	3
Los macrófagos en la respuesta inmune	4
La importancia del proceso de diferenciación	4
Características de los receptores Fc	6
Subunidades de los receptores Fc	6
FcγRI	7
FcγRII	8
FcγRIII	11
Funciones biológicas	12
Transducción de señales	
El motivo ITAM	13
La familia de proteínas tirosina cinasas Src	15
Activación de los miembros de la familia Src	17
Syk	19
PI-3-Cinasa	20
PKC	21
Fosforilación en células THP-1	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
HIPOTESIS	24
OBJETIVO GENERAL	25
METODOLOGIA	26
RESULTADOS	
Evaluación de la disminución de la proliferación de la línea celular THP-1.....	30
Evaluación de morfología de células inducidas a la diferenciación	31
Evaluación de la actividad de las enzimas fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y B-D-Glucuronidasa como indicadores de la diferenciación	31
Efecto de diferentes agentes inductores de la diferenciación	33
Detección de proteínas fosforiladas en tirosina en células sin diferenciar e inducidas a la diferenciación.....	35
Detección de proteínas fosforiladas en tirosina mediante, inmunoprecipitación	38
DISCUSION	45
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFIA	53
APENDICE 1	63
APENDICE 2	65
ABREVIATURAS	67

RESUMEN

Los receptores Fc participan en el reconocimiento de antígenos al captar la fracción Fc de las inmunoglobulinas. Son mediadores importantes de la respuesta celular en defensa contra agentes infecciosos. En el presente trabajo se analizó el patrón de fosforilación de los receptores Fc γ RI y Fc γ RII para humano en respuesta a la agregación en células THP-1 con tratamiento diferenciador 1.2% DMSO y células sin tratamiento.

Se cultivó la línea celular en presencia y ausencia de 1.2% DMSO durante 1, 3, 5 y 7 días. Con la finalidad de evaluar el efecto diferenciador se midió la proliferación celular con azul de tripano encontrándose una fuerte disminución de la proliferación en células con tratamiento, encontrándose una diferencia significativa. Con el mismo fin se analizó la actividad de tres enzimas lisosomales: fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y B-D-Glucuronidasa. Se encontró que aunque hubo mayor actividad enzimática en células inducidas a diferenciarse, la diferencia no fue estadísticamente significativa. Por lo anterior se concluye que el DMSO es un débil diferenciador de esta línea celular.

El análisis de los patrones de fosforilación se realizó en células con 1, 3, 5 y 7 días de tratamiento, al término de los cuales las células fueron estimuladas con anticuerpos antireceptor-Fc γ RI ó antireceptor-Fc γ RII, posteriormente se indujo la agregación de los receptores con un anticuerpo secundario. Las células fueron lisadas, y las proteínas separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a membrana de nitrocelulosa. Al comparar los patrones de activación se obtuvo un fuerte incremento en la fosforilación de una proteína de 50 kDa (kilodaltones) al cabo del quinto día de tratamiento con DMSO.

Se realizó la inmunoprecipitación de los receptores Fc γ RI y Fc γ RII en células estimuladas con 1.2% DMSO y sin estimular durante 3 días. Se analizaron los patrones de fosforilación en tirosina mediante Western-blot.

Los patrones de fosforilación para ambos receptores parecen ser distintos, encontrando que para el receptor Fc γ RI se activan 4 proteínas de aproximadamente 57, 64, 80 y 94 kDa tanto en células tratadas como en células sin tratamiento de diferenciación. Sin embargo, se observa disminución en la fosforilación para las células con tratamiento.

Para el receptor Fc γ RII coprecipitan 6 proteínas fosforiladas en tirosina de 40, 48, 64, 72, 97 y 168 kDa; contrariamente a lo que sucede con el receptor Fc γ RI la fosforilación se incrementó en las proteínas de 64, 72 y 168 kDa para células con tratamiento. Ello podría indicar la posible participación de estas proteínas durante el proceso de diferenciación.

Se comprobó además la fosforilación de ambos receptores durante el entrecruzamiento por medio de un Western-blot utilizando anticuerpos anti-Fc γ RI y Fc γ RII.

INTRODUCCION

Los receptores Fc γ están involucrados en el reconocimiento de antígenos por medio de la captación de la fracción Fc de las inmunoglobulinas tipo G (IgG). Se hallan presentes en la membrana de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células B, células T, células NK, plaquetas, monocitos, macrófagos, células endoteliales, células de placenta, células dendríticas, y células de Langerhans. Son así mediadores importantes de la respuesta celular en la defensa contra agentes infecciosos.

La captación del complejo antígeno-anticuerpo por los receptores Fc conducen a la activación de la región ITAM por proteínas tirosina cinasa de la familia Src en respuesta a la agregación de los receptores en la superficie de la célula, desencadenándose una serie de eventos que consisten en la activación de proteínas tirosina cinasa. En general para los receptores Fc γ resultan activadas, la fosfolipasa C gamma 1 (PLP γ 1), fosfolipasa C gamma 2 (PLP γ 2), Vav, Gap (Kiener et al., 1993). Para los receptores Fc γ R y Fc α R se ha encontrado que la activación de las funciones efectoras depende de la activación de la familia de cinasas de la familia Src. Se ha demostrado la asociación de Lyn al receptor Fc α R (Gulle et al 1998).

Para el caso de los receptores Fc γ de la línea celular THP-1 se tienen antecedentes de algunas de las proteínas que se activan durante el entrecruzamiento de los receptores. Se sabe que se fosforilan rápidamente múltiples proteínas tirosinas cinasas de la familia Src además de los receptores. Algunas de ellas ya han sido identificadas tal es el caso de una proteína de 72 kDa (kilodaltones) conocida como Syk, la cuál se ha encontrado asociada al receptor Fc γ RII (CD32) (Ghazizadeh et al., 1995). Los análisis de inmunoprecipitación del receptor han demostrado que a este receptor se asocian también las fosfoproteínas p59hck (Hck) y p56lyn (Lyn), las cuales son de las más abundantes en el patrón de fosforilación (Ghazizadeh et al., 1995) y pertenecen a la familia Src. Además de la fosforilación de múltiples proteínas tirosina cinasa de 160, 120, 100, 75, 72, 60, 56, 46 y 40 kDa (Ghazizadeh et al., 1994). Se ha reportado que la fosforilación de una proteína de 115 kDa se asocia a la subunidad reguladora p85 de la PI-3-Cinasa, cuando esta última resulta activada por el entrecruzamiento del receptor Fc γ RII. Esta proteína de 115 kDa se le ha identificado como producto del protooncogen c-cbl. Resultando así activadas P-I-3Cinasa y Cbl (Matsuo et al., 1996).

Por otra parte al analizar los resultados de la activación del receptor Fc γ RI (CD64) no se encuentran asociadas las cinasas Hck ó Lyn, sin embargo la ruta de transducción también involucra a la tirosina cinasa Syk (Rezaul et al., 1998; Taylor et al., 1997). Rankin et al., (1993), reporta además la fosforilación de varias tirosinas de 110, 80, 60 y 52 kDa.

Ghazizadeh y Fleit (1994) reportan que las rutas de señalización para los receptores Fc γ RI y Fc γ RII parecen ser distintas, sin embargo los eventos de activación han sido poco elucidados y se desconocen los eventos de señalización en células inducidas a la diferenciación.

MARCO TEORICO

Nuestro sistema inmunológico nos protege contra agentes infecciosos como: bacterias, virus, hongos y otros parásitos. Muchas de las respuestas del sistema inmunológico inician la destrucción y eliminación de los organismos invasores y de las moléculas tóxicas que producen. (Alberts et al., 1983).

De acuerdo a los mecanismos de defensa contamos con la inmunidad natural (también llamada nativa o innata) y la inmunidad adquirida o específica en la cual los mecanismos de defensa son inducidos o estimulados por agentes extraños (Abbas et al., 1995). Cualquier macromolécula extraña al organismo puede inducir a una respuesta inmune, estas moléculas reciben el nombre de antígenos.

Las células que constituyen la inmunidad natural son las células fagocíticas macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y un tipo de linfocitos llamado células asesinas naturales ó NK (natural killer); y por otra parte se encuentran las células que constituyen la inmunidad específica y que consta de los linfocitos T y B así como de los productos que secretan, como los anticuerpos en el caso de las células B. (Alberts et al., 1983).

Existen 2 clases de respuesta específica; la respuesta humoral (células B) y la respuesta mediada por células (células T). Las células T desempeñan un papel regulador crucial en la inmunidad y son necesarias para colaborar con las células B para la producción de anticuerpos (Benjamini et al., 1996).

En la respuesta humoral hay producción de anticuerpos que circulan por la sangre y que se unen específicamente al antígeno extraño que los ha inducido. La unión del anticuerpo al antígeno, facilita a las células fagocíticas la ingestión del antígeno, y a menudo activa un sistema de proteínas sanguíneas, denominadas colectivamente complemento, que ayudan a destruir al agente extraño (bacteria) (Abbas et al., 1995).

La respuesta inmunitaria mediada por células, implica la formación de células especializadas que reaccionan principalmente con los antígenos extraños situados sobre la superficie de las células huésped, ya sea matando la célula huésped si el antígeno es un virus infeccioso, o induciendo a otras células del huésped, como por ejemplo a los macrófagos a destruir el antígeno (Alberts et al., 1983; Abbas et al., 1995).

Los receptores involucrados en el reconocimiento de antígenos del sistema inmune incluyen al receptor de la célula T (TCR), al receptor de la célula B (BCR) y a los receptores Fc (FcR).

Existen receptores Fc específicos para cada tipo de anticuerpo; Fc γ R unen específicamente inmunoglobulina G (IgG), Fc α R, Fc δ R, Fc ϵ R y Fc μ R unen inmunoglobulina A (IgA), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina E (IgE), e inmunoglobulina M (IgM) respectivamente.

La mayoría de los receptores Fc de humano y de ratón son miembros de la superfamilia de la inmunoglobulinas (IgSF), como es el caso de los receptores Fc γ R, los otros pertenecen a la familia de las lectinas.

Los FcR reconocen no a los antígenos, sino a la porción Fc de los anticuerpos. La interacción del complejo inmune (antígeno-anticuerpo) con el receptor específico (Fc γ R) inician un número de procesos biológicos que tienen como fin la destrucción del antígeno mediante la endocitosis del complejo inmune, estimula la secreción de varios mediadores inflamatorios, además modula la respuesta inmune por interacción del Fc γ R con los linfocitos.

Los macrófagos en la respuesta inmune

La función principal de un monocito-macrófago es la ingestión de partículas menores de 0.1 μm mediante fagocitosis, son activos para matar bacterias, hongos y células tumorales (Stites et al., 1993).

Los monocitos-macrófagos constituyen la línea celular de fagocitos mononucleares, los cuales maduran en condiciones naturales, a partir de una célula germinal pluripotencial con ayuda de diversos factores estimuladores de colonias (CSF por sus siglas en inglés Colony Stimulating Factors), que incluyen factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), Interleucina 3 (IL-3), y factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), así como Interleucina 4 (IL-4) e Interferones (IFN). Sin embargo puede inducirse la diferenciación (fin del proceso de maduración) mediante el uso de agentes químicos tanto *in vivo* como *in vitro*.

Los macrófagos poseen receptores de superficie (Fc γ R) que se unen a inmunoglobulinas, IgG1 e IgG3 por sus fragmentos Fc (Hunter et al., 1994). La localización específica del sitio de unión al receptor para el Fc de la IgG3 parece estar en el dominio C $_H$ 3. La captación pasiva de anticuerpos por tales receptores Fc representa la activación de macrófagos, que pueden entonces funcionar de manera citotóxica (Stites et al., 1993).

Las diferencias entre macrófagos activados y macrófagos en reposo son morfológicas, metabólicas y funcionales. Un macrófago activado tiene aumentada la capacidad para matar microorganismos o células tumorales. La activación del macrófago es evidente por los cambios que se presentan, hay cambios morfológicos (mayor tamaño, plegamiento de la membrana plasmática, incremento de la formación de pseudópodos, incremento en el número de vesículas pinocíticas); cambios metabólicos (incremento en el metabolismo de la glucosa y estallido respiratorio oxidante), y cambios funcionales (migración más vigorosa en respuesta a factores quimiotácticos, aumento en la actividad microbicida) debido a la estimulación de los Fc γ R (Kiener et al., 1993).

La diferenciación de monocitos a macrófagos conduce a un aumento en la respuesta a lipopolisacárido (LPS) en términos de un aumento progresivo de Interleucina 6 (IL-6) y TNF- α producidos, y la adquisición de un estado antiviral mediado por IFN- β (Gessani et al., 1993).

La importancia del proceso de diferenciación

Dentro de la médula ósea, a partir de la célula madre pluripotencial, con ayuda de IL-3 se genera un monoblasto, el cual da lugar al promonocito bajo la

influencia de IL-3 y GM-CSF, este promonocito madura a monocito, por acción del GM-CSF, para finalmente dar origen a un macrófago tisular bajo influencia del M-CSF y GM-CSF.

En condiciones *in vitro* se ha logrado inducir a la diferenciación a células transformadas del linaje mielóide tales como las líneas K562 y KG-1, las cuales son líneas cuyo estado de diferenciación es eritroblasto y mieloblasto respectivamente. HL-60 tiene un estado de diferenciación más avanzado: promielocito. Continúan en grado de diferenciación ML-1 y 3 que son mielomonoblastos, U937 es monocito y la línea más madura es THP-1 (Tabla 1).

TABLA 1

Línea celular	Estado de diferenciación	célula a la que diferencia	Inductores de diferenciación
K562 KG-1 HL-60 ML-1 y	Blasto y/o Eritroblasto Mieloblasto Promielocito Mielomonoblasto	Eritroblasto Macrófagos Granulocito, Macrófagos Macrófagos, ocasionalmente granulocitos	Hemina, Butirato Forbol diésteres, Teleodinas Forbol diésteres, DMSO Forbol diésteres, Teleodinas
U937 THP-1	Monocito Monoblasto	Macrófagos Macrófagos	Forbol diésteres, Teleodinas Forbol diésteres

Existen líneas con estados menos diferenciados, por ejemplo la línea celular mielomonocítica WEHI-3B y aun la línea celular HL-60, las cuales dependiendo del factor con que se estimule pueden diferenciarse a granulocito (mediante G-CSF), o hacia macrófago (con forbol diester TPA) (Metcalf et al., 1986). En cambio las líneas más maduras como U937 y THP-1 solo pueden diferenciarse a macrófagos con ciertos agentes. Además de los forbol diésteres, principalmente el TPA, se han reportado agentes eficaces en la diferenciación de la línea THP-1 como: la Bufalina (Numazawa, et al., 1996), la Mizoribina (Kunihiro et al., 1997), el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (Suematsu et al., 1995) y el 1,25-Dihidroxivitamina D₃, (Bhalla et al., 1989) aunque se ha reportado que todos los derivados de la vitamina D, provocan diferenciación en células del linaje mielóide. El TPA, la 1,25-Dihidroxivitamina D₃, y el ácido retinoico (Bhalla et al., 1989) tienen también efecto en U937 (una línea muy similar en comportamiento y estado de madurez a THP-1).

Este aumento en el metabolismo se ha comprobado numerosas veces (Takeda et al., 1982; Tsuchiya et al., 1982; Collins et al., 1979) en células leucémicas como ML-3 y HL-60, con el agente diferenciador TPA, el cual conduce a macrófago; un aumento en la adherencia de hasta 95%, desarrollo de pseudopodos del 40%; morfología de macrófago en un 95%; fagocitosis del 60%; reducción de azul de tetrazolio de hasta 40%; aumento en la expresión de receptores Fc de hasta un 20%. Además de un aumento en la secreción y actividad de enzimas tales como: beta-glucuronidasa y fosfatasa ácida las cuales se incrementan de 2 a 20 veces con la diferenciación a macrófagos (Koeffler, 1983).

La línea celular THP-1, expresa los 3 tipos de receptores para IgG, se reportan de 10 a 30×10^3 receptores Fc γ R1/célula y de 50 - 70×10^3 receptores Fc γ R2/célula en condiciones normales, sin embargo estas cifras aumentan cuando se estimula con IFN- γ , el receptor Fc γ R3 se encuentra muy poco expresado (Fanger et al., 1989).

Actualmente tiene gran importancia la investigación en el proceso diferenciador de células tumorales, como es el caso de la leucemia mieloide aguda (AML) originada de una transformación neoplásica que conduce a un bloqueo en la maduración celular y como consecuencia una reorganización del estado mieloblasto o promielocito. Los pacientes leucémicos mueren debido a que las células blasto no maduran al estado funcional, en cambio proliferan y se acumulan rápidamente. Una cuestión central en el estudio de AML, es que las células leucémicas son capaces de madurar bajo ciertas condiciones ambientales lo cual tiene importancia terapéutica. (Koeffler, 1983).

Características de los receptores Fc

Desde un punto de vista funcional los receptores Fc se pueden dividir en dos tipos, los que activan a las células y los que no las activan. Los receptores que activan a las células poseen uno o varios dominios citoplasmáticos semejantes a los motivos del BCR ó del TCR. Incluso muchos FcR comparten los motivos activadores con el BCR ó TCR bajo condiciones apropiadas y activan respuestas celulares usando las mismas rutas de transducción que los receptores antigénicos. Los receptores que no activan a las células no tienen dominio ITAM (Daerón, 1997).

Los receptores Fc son miembros de la familia de las inmunoglobulinas, en el hombre encontramos 3 clases de estos receptores hFc γ R1 (CD64), hFc γ R2 (CD32), hFc γ R3 (CD16) los cuales dan origen a 12 diferentes isoformas.

Se han identificado y mapeado un total de 8 genes para los Fc γ Rs a lo largo del cromosoma 1. Los genes que codifican para los receptores Fc γ R son similares para ratones y humanos. Tres genes codifican para el receptor de alta afinidad Fc γ R1 (Fc γ RIA, Fc γ RIB y Fc γ RIC) (Ernst et al., 1992) y cinco genes para los receptores de baja afinidad Fc γ R2 (Fc γ RIIA, Fc γ RIIB y Fc γ RIIC) (Qui et al., 1990) y Fc γ R3 (Fc γ RIIIA y Fc γ RIIIB) (Ravetch y Perussia, 1989).

Subunidades de los Fc γ R

Cada receptor Fc γ humano posee una subunidad α con 3 regiones: una extracelular, una transmembranal y una citoplasmática, excepto en los receptores solubles (sFc γ R1b $_1$, sFc γ R1c, sFc γ R2a $_2$, sFc γ R3a y sFc γ R3b) y una subunidad homodimérica $\gamma\gamma$, $\zeta\zeta$ ó heterodimérica $\gamma\zeta$, con 2 regiones, la transmembranal y la citoplasmática. En los 3 tipos de Fc γ R la cadena α es la responsable de la fijación del ligando pues esta subunidad contiene los dominios tipo inmunoglobulinas de la clase C $_2$ localizados en la región extracelular (Ravetch, 1994).

La asociación de las cadenas γ es esencial para la transducción de señales, lo cual se comprobó en células linfoides, mieloides y fibroblásticas transfectadas con 2 isoformas de Fc γ RIII (Fc γ RIIIA y Fc γ RIIIB) y una quimera $\gamma\alpha$, encontrando que la cadena γ es la responsable del proceso de transducción (Wirthmueller et al., 1992). Interesantemente la alta afinidad de Fc γ RI está asociada con las cadenas homodiméricas $\gamma\gamma$, en células U937 diferenciadas (no así en células no diferenciadas) (Ernst et al., 1993). La subunidad γ además de mediar la señalización al interior de la célula es esencial para el ensamblado del receptor en la superficie celular (Ravetch, 1994).

Fc γ RI

El Fc γ RI (CD64) humano es una glicoproteína integral de membrana la cual puede unir IgG monómera con alta afinidad. Mediante electroforesis en presencia de SDS la molécula tiene un peso molecular aparente de 72 kilodaltones (Anderson, 1982). Su constante de afinidad (Kd) está entre 10^8 y 10^9 M $^{-1}$ (Anderson y Abraham, 1980). Este receptor posee una región extracelular de 292 aminoácidos con 3 dominios C2 semejantes a los de la inmunoglobulina (Allen y Seed, 1989) (Figura 1), 21 aminoácidos en la región transmembranal y un tallo citoplasmático de 61 aminoácidos. Los 3 dominios tipo C2 de la región extracelular son únicos para Fc γ RI y no se hallan en Fc γ RII ó Fc γ RIII.

Este receptor es constitutivamente expresado en monocitos y macrófagos y en todas las líneas celulares de este linaje como U937, HL60 y THP-1 (Looney et al., 1986), y puede ser inducido en neutrófilos y eosinófilos. (Fanger, et al., 1989). El Interferón- γ (IFN- γ) modula esta expresión; granulocitos, neutrófilos y eosinófilos cultivados toda la noche en presencia de IFN- γ ó factor estimulador del crecimiento de granulocitos (G-CSF) expresan un alto número de estos receptores (Perussia et al., 1983). En monocitos y macrófagos y líneas celulares asociadas el número de receptores se incrementa de 10 a 20 veces incubando en presencia de IFN- γ (Guyre et al., 1983).

Se han identificado 3 isoformas, codificadas por los genes: Fc γ RIA, Fc γ RIB y Fc γ RIC. Estos genes se distribuyen en las bandas p12-13 y q21 mientras que las subunidades α y γ de Fc ϵ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII se ubican en la banda q22 (Qui et al., 1990). Los genes para Fc γ RI están constituidos por 6 exones, 2 codifican para el péptido señal, un exón para cada dominio C2 y un exón para las regiones transmembranal y citoplasmática.

Fc γ RI une específicamente IgG1 e IgG3 (Kurlander y Batker, 1982), aunque puede unir con baja afinidad IgG4. A causa de la alta afinidad del Fc γ RI por su ligando el número de receptores es alto, varía de acuerdo al tipo celular y puede ir de 10^4 a 4×10^4 /célula (Anderson y Abraham, 1980; Fries et al., 1982)

Existen varios anticuerpos monoclonales específicos para Fc γ RI, los cuales se unen al menos a dos sitios distintos determinantes del receptor, estos sitios son de unión con el ligando. Los anticuerpos monoclonales 32 (Anderson et al., 1986) y 62 se unen a un epitope distinto al que se unen los anticuerpos 22 y 44; ninguno de estos anticuerpos inhibe la unión del ligando. El anticuerpo 197 bloquea el sitio de unión al ligando debido a que es una IgG2 con alta afinidad por el sitio de unión

(Anderson, 1989). El anticuerpo 10.3 se une cerca del sitio de unión y esto inhibe la unión del complejo inmune pero no del ligando solo (Dougherty et al., 1987). (Tabla 2)

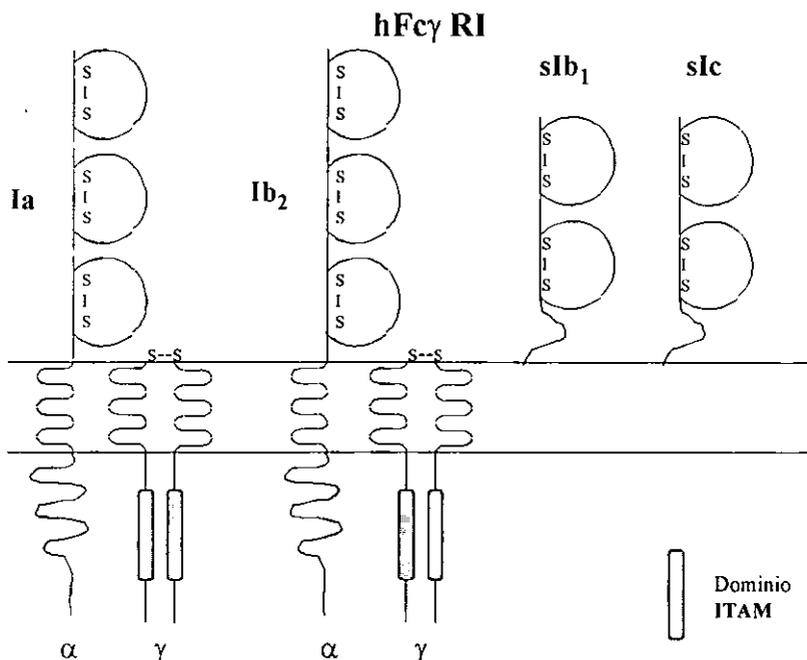


FIGURA 1. Representación esquemática de los cuatro isoformas del receptor $Fc\gamma RI$, conteniendo las 3 regiones: extracelular con dominios tipo CH2 (inmunoglobulina), transmembranal mediante la cual el receptor se ancla a la membrana citoplasmática donde los cilindros representan la región ITAM [D/E-X(2)-Y-X(2)-L/I-X(7)-Y-X(2)]. Los receptores $Fc\gamma RIb_1$ y $Fc\gamma RIc$ son formas solubles del receptor unidas a la membrana por un enlace glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (Winkel y Capel, 1993).

$Fc\gamma RI$

El receptor clase II humano $Fc\gamma RI$ (CD32) fue por muchos años poco estudiado debido a su baja afinidad por la IgG, los métodos para unir IgG al receptor no permitían percibirlo (Kurlander et al., 1984; Kulczycki, 1984). Solo mediante múltiples ligandos fue posible detectarlo. Mediante análisis por electroforesis SDS-PAGE, el receptor presenta un peso molecular aparente de 40 kilodaltones (Rosenfeld et al., 1985). Tiene una constante de afinidad baja, menor a $10^7 M^{-1}$. Este receptor une sólo IgG en forma de complejo ó polímero.

TABLA 2. Características generales de los receptores Fc γ humanos

Tipo de receptor	Molécula	Genes (cromosoma)	Transcritos	Afinidad por IgG (K _a)	Monoclonales	Expresión Constitutiva	Inducida
hFc γ RI (CD64)	72 kDa	(1q21.1) hFc γ RIA hFc γ RIB hFc γ RIC	hFc γ RIa shFc γ RIb1 hFc γ RIb2 shFc γ RIc	Alta (10 ⁸ -10 ⁹ M ⁻¹)	32,197,22 44,62,10.1	monocitos, macrófagos líneas celulares mieloides	neutrófilos (IFN- γ , G-CSF) eosinófilos (IFN- γ)
hFc γ RII (CD32)	40 kDa	(1q23-24) hFc γ RIIA hFc γ RIIB hFc γ RIIC	hFc γ RIIa1 hFc γ RIIa2 hFc γ RIIb1 hFc γ RIIb2 hFc γ RIIb3 hFc γ RIIc	Baja (<10 ⁷ M ⁻¹)	IV,3,2E1 KB61,AT10 KuFc79 CIKM5 41H16	monocitos, neutrófilos eosinófilos, basófilos macrófagos, células B células de langerhans células endoteliales plaquetas, células de placenta, líneas celulares mieloides.	
hFc γ RIII (CD16)	50-80 kDa	(1q23-24) hFc γ RIIIA hFc γ RIIIB	hFc γ RIIIa hFc γ RIIIb	Media (\pm 3 X 10 ⁷ M ⁻¹) Baja (<10 ⁷ M ⁻¹)	3G8, B73.1 VEP13, GRM1 CLBGran1 CLBGran11 BW209/2 1D3, MG38 Leu11a/b/c	monocitos macrófagos células NK células T neutrófilos	monocitos (TGF β) eosinófilos (IFN- γ)

El análisis de DNA ha revelado que estas proteínas contienen regiones extracelulares de 180 aminoácidos que conforman dos dominios tipo inmunoglobulina (C2), una región transmembranal de 27 a 29 aminoácidos y un dominio citoplasmático de longitud variable (44 a 76 aminoácidos) (Brooks et al., 1989).

Este receptor es el más ampliamente distribuido en monocitos y macrófagos; granulocitos incluyendo neutrófilos y eosinófilos; células B; y plaquetas (Cohen et al., 1983; Looney et al., 1986^a).

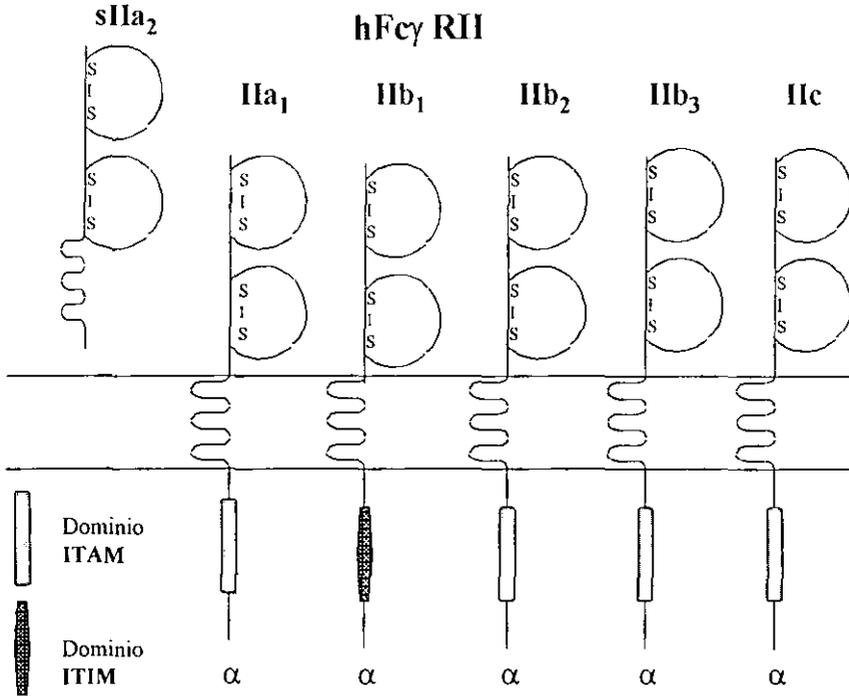


FIGURA 2. Representación esquemática de los seis diferentes transcritos para el receptor FcγRII, los dominios extracelulares están unidos por puentes disulfuro y al igual que los receptores tipo I y III pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. El receptor FcγRIIa₂ es una forma soluble. El FcγRIIb₁ posee un motivo de regulación negativa conocido como ITIM, en la región citoplasmática (Winkel y Capel, 1993).

Para el receptor tipo II se han identificado 6 diferentes transcritos codificados por un total de 3 genes: FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIC (Figura 2) localizados en el cromosoma 1 banda q23-24 (Qui et al., 1990). En contraste al receptor FcγRI y FcγRIII donde un exón codifica las regiones citoplasmática y transmembranal, para el FcγRII tres distintos exones codifican para la región citoplasmática (C1-C3), los productos de los genes IIA y IIB difieren en el péptido señal y en la región

citoplasmática. Se sabe que el gen Fc γ R1IC genera una vía desigual de entrecruzamiento a los genes Fc γ R1IA y Fc γ R1IB. El sitio de entrecruzamiento fue mapeado aproximadamente 300 nucleotidos abajo del exón C1 (Winkel y Capel, 1993).

Su expresión en la superficie celular varía de acuerdo al tipo de célula, en plaquetas encontramos un número de alrededor de 1000 receptores/célula y en macrófagos hay más de 40,000 (Karas et al., 1982). Las cuatro subclases de IgG son capaces de activar plaquetas a través del Fc γ R1I, aunque las IgG1 e IgG3 se unen con más facilidad a la superficie de estas células.

Los anticuerpos monoclonales específicos para este receptor son el anticuerpo IV.3, 2E1 (Farance et al., 1988) KB61 (Pulford et al., 1986), 41H16, AT10, KuFc79 y CIKM5 el cual puede unirse a Fc γ R1I.

Fc γ R1III

El receptor Fc γ R1III humano (CD16), al igual que el receptor Fc γ R1I es un receptor de baja afinidad y no puede ser percibido por unión directa del ligando, se requieren complejos inmunes. Este receptor migra en geles SDS-PAGE entre los 50 y 80 kilodaltones debido a su continua glicosilación (Lanier et al., 1988; Fleit y Kuhnle, 1988). Tiene una constante de afinidad media: aproximadamente 3×10^7 M⁻¹ para el transcrito Fc γ R1IIa, y baja: menor a 10^7 M⁻¹ para el transcrito Fc γ R1IIb.

Al igual que los otros receptores Fc γ R1III una específicamente IgG1, aunque los neutrófilos parecen ser incapaces de unir IgG3 (Kulczycki, 1984). Se ha estimado que el número de receptores en varios tipos celulares está en un rango de 2×10^5 /célula (Fanger et al., 1989).

Para el receptor tipo III se han identificado 2 genes Fc γ R1IIIA y Fc γ R1IIIB que codifican para 2 transcritos ambos se localizan en el cromosoma 1 bandas q23-24, a una distancia de 200 kilobases del gen Fc γ R1I. Los productos de ambos genes codifican proteínas con regiones extracelulares de aproximadamente 190 aminoácidos consistentes en 2 dominios tipo IgG. El gene Fc γ R1IIIA codifica para un receptor transmembranal de 25 aminoácidos, mientras que el producto del gen Fc γ R1IIIB está unido al exterior de la membrana plasmática por un enlace glicosilfosfatidilinositol (GPI). La diferencia más importante entre los productos de los 2 genes del Fc γ R1III está localizada en el aminoácido 203, una serina en el Fc γ R1IIb determina el enlace GPI, es decir que se forme el receptor soluble, y una fenilalanina en Fc γ R1IIa codifica para las regiones transmembranal y citoplasmática, es decir se forma el receptor fijo a la membrana. El receptor Fc γ R1IIb se expresa en granulocitos y eosinófilos, es de baja afinidad; en cambio el receptor Fc γ R1IIa se expresa en monocitos (subpoblaciones), macrófagos, células NK y algunas células T (Braakman et al., 1992) (**Figura 3**).

Existen varios anticuerpos monoclonales para este receptor, los más empleados son 3G8, 4F7 (Fleit et al., 1982), VEP13 (Rumpold et al., 1982) Leu11a/b/c, B73.1, CLB Gran1 y CLB Gran11.

Por otra parte la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG es acompañada por la liberación de IL-1 (Simms et al., 1991).

El entrecruzamiento de Fc γ RII y Fc γ RIII también puede activar la fagocitosis aunque de manera parcial (Anderson et al., 1990) lo cual se ha comprobado en fibroblastos de la línea celular 3T6 (Tuijman et al., 1992) y en la línea celular COS (Indik et al., 1991), ambas transfectadas con el receptor Fc γ RIIIa. Se observó que el Fc γ RIIIa es mediador en la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG, así como de la ADCC en varios tipos celulares, (Fanger et al., 1989); Fc γ RII regula el estallido respiratorio en neutrófilos (Huitzinga et al., 1989). Otros estudios reportan que Fc γ RIIb puede activar además de la ADCC, la liberación de enzimas lisosomales y la generación de aniones superóxido (Fanger et al., 1989).

Transducción de señales

El motivo ITAM

Para que se de la respuesta celular mediada por receptores Fc, éstos deben agregarse en la superficie de la célula por la unión de anticuerpos y antígenos multivalentes.

La regulación de la respuesta inmune es efectuada por un gran número de receptores celulares que al interactuar con su ligando (el complejo inmune) se lleva a cabo el entrecruzamiento y activación del receptor, lo cual se comprobó con el receptor para IgE en células cebadas (Segal et al., 1977). Esto desencadena una serie de eventos conocidos como señalización o transducción de señales, durante los cuales los residuos de tirosina (Santana et al., 1996) que se localizan en la secuencia conservada denominada ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) (Cambier, 1994) ó ARAM (antigen recognition activation motif) en la región citoplasmática son fosforilados (Weiss, 1993).

Esta secuencia fue descrita inicialmente por Reth (1989). El primer aminoácido específico del motivo está cargado negativamente, puede ser ácido aspártico (D) ó ácido glutámico (E); el tercero y el quinto son tirosinas (Y) y el cuarto y el sexto son leucina (L) ó isoleucina (I). Los 6 aminoácidos se localizan siempre a la misma distancia y forman una α -hélice en diversos receptores como son: CD3, el receptor de la célula T (TCR), Fc ϵ RI, Ig α e Ig β (Reth, 1989).

Los receptores Fc que activan a las células, tienen 2 tipos de dominios ITAM. El primero de ellos cuya secuencia es D/E-X(2)-Y-X(2)-L/I-X(7)-Y-X(2)-L/I, está presente en la mayoría de FcR, posee 7 residuos variables entre las 2 secuencias YXXL; son receptores multicadena compuestos de una subunidad α que une al ligando y se asocia con una ó dos subunidades de transducción de señales en el citoplasma y en la cual se localiza el ITAM. El segundo tipo de receptores posee 12 residuos en lugar de 7 entre las mismas 2 secuencias YXXL, y sólo tienen una cadena (Fc γ RIIA y Fc γ RIIC) (Cambier et al., 1994).

Los receptores Fc que no activan a las células se pueden dividir en 2 categorías, la familia con una sola cadena tipo Ig como en el caso del receptor Fc γ RIIB, cuyo dominio citoplasmático, posee un motivo que inhibe la activación

celular iniciada por otros receptores. Este motivo contiene una sola secuencia YXXL y se le conoce como Inhibitor Tyrosine-based Motif (ITIM) (Daerón et al., 1995). La segunda categoría de estos receptores no inhibe ni activa a las células. Están involucrados en el proceso de transcitosis de Ig a través del epitelio, son los receptores poliméricos (pIgR) para IgA e IgM, y los receptores neonatales para IgG (FcRn). Finalmente el receptor para IgG sin ITAM (FcγRIIB) no es capaz de activar por sí mismo, pero contribuye en la señalización asociándose con otros receptores (Daerón, 1997).

La región conocida como ITAM, es la responsable directa del proceso de señalización. Estudios realizados en receptores mutados indican que la fosforilación del dominio ITAM es necesaria para que ocurra la señalización (Isakov, 1998). La importancia del ITAM fue revelada por experimentos de ingeniería genética, en los cuales se modificó al receptor utilizando receptores quiméricos que poseían tallos citoplasmáticos de largos variables, en el caso del ITAM de CD3ε encontraron que posee un número menor o igual a 22 residuos (Romeo, et al 1992), 18 de los cuales permiten transducir las señales que activan la movilización de calcio (Ca^{2+}), la producción de IL-2, la fosforilación en tirosina y la inducción de la actividad citotóxica. Los residuos conservados de leucina/Isoleucina parecen ser esenciales para activar la señal (Letourner y Klausner, 1992).

El modelo actual de señalización para el inmunoreceptor, propone que el ITAM es fosforilado en sus residuos de tirosina por interacción con proteínas tirosina cinasas de la familia Src, en respuesta a la agregación de los receptores. Estos residuos fosforilados constiuyen un sitio de anclaje para las proteínas tirosina cinasas de las familias Src y Syk/ZAP 70, las cuales al unirse a los ITAM fosforilados se activan, aumentando su actividad catalítica (Iwashima et al., 1994). Estas cinasas activadas catalizan la fosforilación y activación de varios sustratos celulares como la fosfolipasa $Cy1$ (PLC $\gamma1$) (Azzoni et al., 1992; Liao et al., 1992), una cinasa activadora de mitógeno (MAPK), fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3-Cinasa), entre otras (Figura 4). El sustrato en particular depende del tipo de célula, la función celular activada, y el tipo de receptor que se esté activando.

Aunque el sistema de transducción de señales en la estimulación de receptores Fcγ no ha sido bien establecido, numerosos estudios sugieren que participan varias proteínas tirosina cinasas de la familia Src tales como: Lyn, Fyn, Fgr, Hck, Yes, Lck y la cinasa Syk como resultado del entrecruzamiento de los receptores (Agarwall et al., 1993; Ghazizadeh et al., 1994b).

Estudios recientes señalan que el proceso de transducción de señales en FcγR involucran la fosforilación en residuos de tirosina, lo cual se ha demostrado ampliamente en una gran cantidad de células con este receptor, como células T, células B, células NK, monocitos y plaquetas (Eiseman y Bolen, 1992; Samelson et al., 1990), además de la hidrólisis del fosfatidilinositol fosfato y la movilización intracelular del calcio.

Se ha encontrado que los miembros de la familia Src están involucrados en el proceso de transducción de señales de la fagocitosis, aunque no se conoce con detalle el mecanismo (Santana et al., 1996). Las plaquetas proveen un sistema de

estudio para los eventos de señalización a través de receptores Fc, ya que sólo expresan Fc γ RII, cuando este receptor se entrecruza e inmunoprecipita se detectan varias proteínas fosforiladas de 150, 119, 107, 97, 93, 85, 82 y 68 kDa, así como una proteína de 40 kDa que corresponde al receptor (Huang et al., 1992).

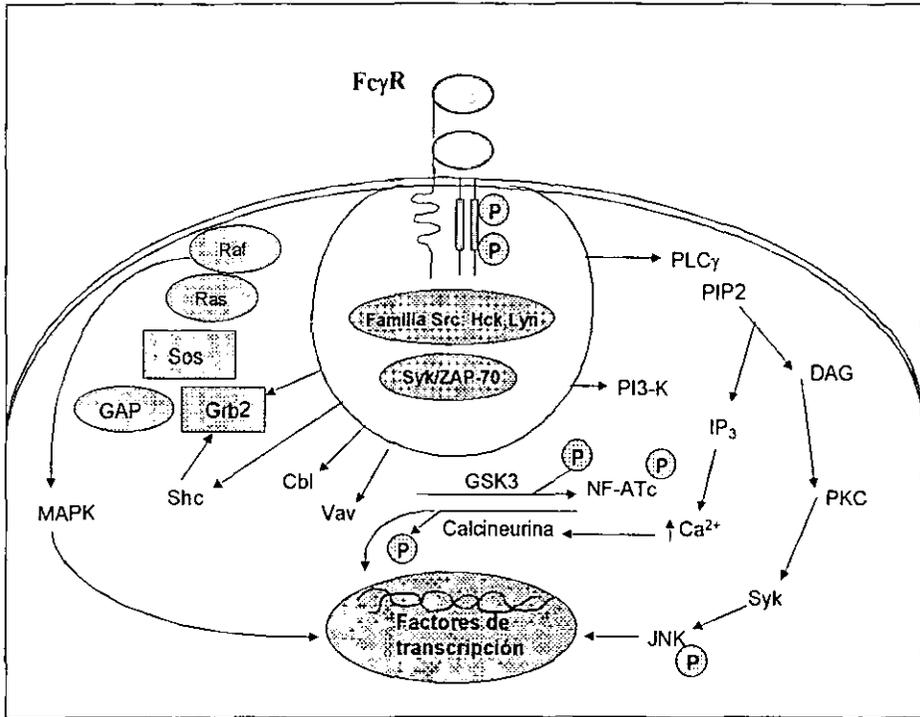


FIGURA 4. El entrecruzamiento de Fc γ R, genera la fosforilación del dominio ITAM en sus residuos de tirosina lo cual sirve de anclaje a las proteínas tirosina cinasas de la familia Src. Estos eventos activan por un lado la hidrólisis del PIP2 para la hidrólisis del DAG, la liberación de calcio y activación de los factores de transcripción, y por otro lado activación de la ruta de p21ras, lo cual resulta en la fosforilación de Raf y posteriormente de la cinasa MAP que se transloca al núcleo, donde su blanco son factores de transcripción.

La familia de proteínas tirosina cinasas Src

Estas enzimas se encuentran involucradas en el proceso de transducción de señales que controlan el crecimiento celular, así como funciones especializadas de células diferenciadas (Eiseman y Bolen, 1990).

La familia Src consta de 8 miembros: c-src, c-yes, fyn y lyn que se expresan en gran variedad de células y tipos de tejidos y se expresa por lo regular más de un

miembro de la familia. Lck, hck, c-fgr y el gen blk presentan un patrón mas limitado de expresión y se hallan en diferentes tipos de células de origen hematopoyético (Tabla 3). Sin embargo cada una de estas cinasas puede diferir en la distribución en tejido, compartimentalización subcelular y sustrato específico (Cooper y Howell, 1993).

Seis de estas cinasas: Lck, Fyn, Lyn, Hck, Fgr y Blk se expresan en células hematopoyéticas y están involucradas en la ruta de transducción de señales. p56^{lck} y p60^{lyn}, están involucradas en la señalización y activación de células T (Burkhard et al., 1994), p56^{blk}, p56^{lyn} y p60^{lyn} participan en la activación de células B (Saouaf et al., 1994; Yamanashi et al., 1990). La participación de p56^{lyn} y p60^{yes} se ha demostrado después de la activación de FcεRI en células cebadas (Eiseman y Bolen, 1992; Penhallow et al., 1995).

TABLA 3

Miembros de la familia Src	Peso molecular (kDa)	Células T	Células B	Células NK	Monocitos	Granulocitos	Plaquetas
c-src	60			X	X	?	XXXXX
c-yes	62	XX		XX		?	X
fyn	59-60	XXX	XXX	XXX	X		X
lyn	55-58		XXX	XX	XX	?	XX
lck	56	XXXXX		XXXX			
hck	59-64				XXXX	?	X
c-fgr	58				XX	XXX	
blk	56		XXXX				

TABLA 3. Expresión relativa de las proteínas tirosina cinasas, miembros de la familia Src, en células de origen hematopoyético, la expresión relativa se determinó por ensayos de cinasas (Bolen, 1991).

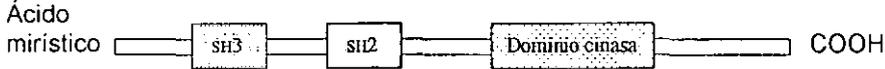
Estas enzimas se hallan asociadas físicamente al receptor transmembranal. Una pequeña fracción de las cinasas de esta familia se asocia directamente con el inmunoreceptor. Fyn se une directamente a la cadena ε de CD3 (Samelson et al., 1990), Fyn, Lyn y Blk se asocian a las cadenas α y β del receptor de células B (Clark et al., 1992).

Se ha demostrado por otra parte la asociación de p56^{lck} con el receptor FcγRIIA en células asesinas naturales (NK) la activación de p56^{lck} ocurre rápidamente (menos de 30 segundos), otras proteínas que se han encontrado asociadas a FcγRIIA son la subunidad ζ del receptor de la célula T (TCR), y ZAP-70 (Cone et al., 1993).

En el caso del receptor antigénico de la célula T (TCR) la señalización se inicia por interacción de las proteínas tirosinas cinasas (PTK's) (Letourner y Klausner, 1992). La agregación del receptor por un estímulo extracelular activa las funciones efectoras de la célula T a través de la cadena ζ del receptor (Romeo et al., 1992) (una proteína transmembranal dimerica), en el residuo 17 de la secuencia motivo

interactúa con la cinasa ZAP-70; una tirosina cinasa restringida a linfocitos T y células NK, implicada en la vía de señalización del TCR. Dicha interacción se lleva a cabo a través de 2 dominios con homología src (Iwashima et al., 1994). Se ha encontrado también asociación con p60^{lyn} (Samelson et al., 1990).

Proteínas tirosina cinasa de la familia Src: Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck y Fgr.



Proteínas tirosina cinasa de la familia Syk: Syk, ZAP-70

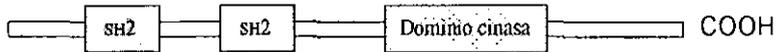


FIGURA 5. Proteínas que interactúan con la región ITAM. La unión de estas proteínas a la región motivo del ITAM se efectúa a través de los dominios SH2 de las tirosinas con la región bifosforilada del dominio ITAM. Esto permite que sean activadas las tirosinas Syk y/o ZAP-70 para posteriormente desencadenar los eventos de señalización (Isakov, 1998).

Activación de los miembros de la familia Src

Los miembros de la familia src presentan una organización similar (Bolen, 1991). La secuencia requerida para la miristoilación (unión de un ácido graso a la proteína para que ésta pueda unirse a la membrana) se encuentra en el extremo amino terminal de la enzima en el cual el miristato se une covalentemente a la glicina en la posición 2. Adyacente a este dominio se encuentra una región única de 50-80 aminoácidos que varía entre los diferentes miembros de la familia Src, este dominio es el que quizá controla las interacciones específicas entre las PTK de la familia Src y otras proteínas celulares (Bolen, 1991). La siguiente región de aproximadamente 60 aminoácidos contiene las regiones SH2 y SH3 (SH de homología Src) (Stahl et al., 1988). (Figura 5).

Los análisis genéticos sugieren que los dominios C-terminal, SH2 y SH3 son importantes para regular la actividad de las proteínas tirosina cinasa (PTK) de la familia Src (Bolen, 1991). El dominio SH3 puede ayudar en la localización de la enzima, desde el citoesqueleto hacia la membrana plasmática (Roadaway et al., 1989), para interactuar con otras proteínas con regiones ricas en prolina. Tal es el caso de la cinasa Lck cuyas regiones ricas en prolina del dominio SH3 interactúan con la región SH3 de otras proteínas como son c-Cbl, PI-3-Cinasa, Ras-GAP, HS1 y CD2 (Denny et al., 1999). El dominio SH2 representa una región de unión de las fosfotirosinas (Matsuda et al., 1990). La región carboxilo terminal representa casi siempre el dominio catalítico o de cinasa, es una región con homología Src (homología src 1 ó dominio SH1).

Semejante a otros miembros de la familia Src, Lck contiene un dominio cinasa C-terminal, un dominio SH2 y un dominio SH3, este último le permite interactuar con otras proteínas mediante la unión de secuencias

En su estado natural la enzima Src se asocia a la membrana mediante un receptor transmembranal, manteniendo una actividad baja. La activación de las proteínas de la superficie celular asociadas con la enzima requieren la dimerización del receptor; de este modo se coaproximan y se asocian las PTKs no receptores. Esta coaproximación estimula la autofosforilación de la tirosina lo cual resulta en un cambio conformacional. De este modo se incrementa la actividad de las PTK y permite que el sustrato seleccionado se una a la enzima activada y sea fosforilado (Bolen, 1991) (Figura 6).

Las cinasas Src poseen un residuo conservado de tirosina en el carboxilo terminal, que cuando son fosforilados, interactúan directamente con el dominio SH2 autólogo; así la fosforilación del residuo de esta tirosina regula negativamente la actividad de la cinasa (Cooper y Mac Auley, 1988).

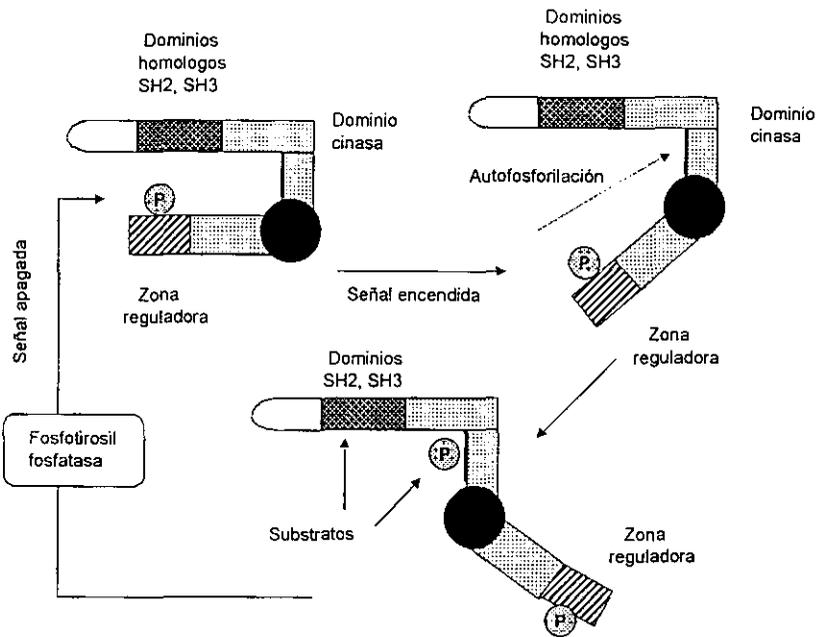


FIGURA 6. Modelo de activación fisiológica de los miembros de la familia Src, iniciada por la coaproximación de otra proteína tirosina cinasa (PTK). Ello estimula la autofosforilación resultando en un cambio conformacional que permite a la enzima actuar sobre su sustrato.

Syk

Syk es una proteína tirosina cinasa compuesta de 2 dominios con homología Src (SH2)² y un dominio catalítico; pertenece a la familia de tirosinas Syk/ZAP-70. Participa en la activación de múltiples receptores inmunes, como el receptor para IgE (FcεRI) (Benhamou et al., 1993; Hutchcroft et al., 1992a) y los receptores para IgG (FcγRI y FcγRII) (Agarwall et al., 1993; Durden y Liu, 1994). Una vez que ha sido activado un inmunoreceptor, Syk es reclutada y asociada directamente a las tirosinas fosforiladas del dominio ITAM (Hutchcroft et al., 1992b).

Se ha identificado a la proteína tirosina syk involucrada en la señalización de otros receptores de reconocimiento inmune como el receptor antigénico de linfocitos B (Hutchcroft et al., 1992b), el cual es una inmunoglobulina de superficie que se asocia con moléculas adicionales para formar el complejo de señalización e iniciar una cascada de eventos bioquímicos en los cuáles se incrementa la actividad de proteínas tirosina cinasas de 150, 123, 101, 81, 69 a 73, 59, 61, 51 y 42 kDa (Gold et al., 1990).

En células de la línea mielomonocítica WEHI 231, también se ha comprobado que el entrecruzamiento del receptor conduce a la rápida fosforilación en tirosina de la proteína syk72 y otras cinasas de la familia Src como lyn (Yamanashi et al., 1991), blk y fyn (Burkhardt et al., 1991). Se ha observado además que el aumento en la actividad de estas proteínas tirosina cinasa se debe a la activación de la fosfolipasa C y a la generación de inositol (Hutchcroft et al., 1991).

El entrecruzamiento de los receptores FcγRI y FcγRII en células HL-60 induce una rápida fosforilación en tirosina, para el receptor FcγRI tiene su máximo de 5 a 10 minutos después del entrecruzamiento, mientras que para el FcγRII la fosforilación ocurre antes de los primeros 5 minutos. Los ensayos de cinasas e inmunoprecipitación revelan la presencia de una proteína de 72 kDa identificada como p72^{syk} (syk), así como una proteína de 68 y otra de 115 kDa en ambos receptores (Agarwal et al., 1993).

Por otra parte se sabe que la fosforilación en tirosina de FcγRII desencadena la ruta de señalización de p21 ras (Figura 4), en la cuál la proteína adaptadora Shc, que no tiene dominios SH2, es fosforilada en el residuo 317 de tirosina creándose un sitio de unión concenso para el dominio SH2 de otra proteína adaptadora Grb2 la cuál está compuesta de un dominio SH2 y dos dominios SH3 los cuales flanquean al dominio SH2 (Ravichandran et al., 1995). Estos dominios SH3 de Grb2 median la interacción entre Grb2 y el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (Sos), vía dominios SH3, Grb2 interactúa con las secuencias ricas en prolina de Sos. La unión del dominio SH2 de Grb2 a Shc, forma al complejo Shc/Grb2/m-Sos-1, este complejo se trasloca a la membrana celular e induce el intercambio de GDP por GTP en ras, resultando en la activación de ras.

Se ha encontrado recientemente que la señalización a través de FcαR se realiza a través de la subunidad γ y del receptor FcαR puesto que esta cadena γ contiene un motivo funcional que se acopla a estos receptores durante la cascada de señalización. En FcαR de células U937 inducidas a la diferenciación con IFN-γ,

se ha encontrado la activación de las proteínas adaptadoras Grb2, Shc, SHIP, Crkl, Cbl y SLP-76 durante el proceso de transducción (Park et al., 1999).

La unión de GTP a Ras activa una cascada de serinas/treoninas cinasas, esto se inicia con la activación del dominio efector de ras el cual interactúa con una región reguladora amino terminal de la cinasa serina/treonina Raf, resultando en el reclutamiento de Raf a la membrana plasmática (Sun et al, 1994). Aunque la interacción de Ras-Raf obligatoriamente activa a Raf, (Stokoe et al., 1994), Raf una vez activada fosforila y así activa a la tirosina cinasa MEK, la cual fosforila en sus residuos de tirosina a la cinasa MAP (Nebreda, 1994). Esta cinasa MAP una vez activada fosforila múltiples sustratos citoplasmáticos incluyendo otras serinas/treoninas cinasas, además de trasladarse al núcleo donde su blanco son factores de transcripción (Karnitz et al., 1996).

PI3-Cinasa

La fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3-Cinasa) es una cinasa lipídica constituida de una subunidad reguladora de 85 kDa (p85) y una subunidad catalítica de 110 kDa (p110) (Carpenter et al., 1990) La subunidad p85 contiene un dominio SH2 que puede unirse en la membrana a las proteínas fosforiladas en tirosina induciendo así la activación de la enzima (Cantley et al., 1991). Recientemente se ha sugerido la participación de esta cinasa lipídica en la señalización del receptor Fc γ , la activación de Fc γ RI y Fc γ RII (Noriyuki et al., 1994) en células U937 induce un incremento en la actividad de PI3-Cinasa (Ninomiya et al., 1994). Una vez que esta enzima ha sido activada a causa de la liberación de calcio intracelular, puede activar una gran variedad de receptores con dominios de tirosina cinasa como los receptores para citocinas, el receptor de la célula T (TCR), el receptor de la célula B (BCR). Se ha demostrado que el entrecruzamiento del BCR incrementa 6 veces los niveles de PI-3,4 bifosfato en líneas maduras de célula B como BAL-17 e inmaduras como WEHI-213; dicho aumento ocurre a los 15 segundos (Gold y Aebersold, 1994).

El entrecruzamiento de Fc γ RI y Fc γ RII en neutrófilos humanos induce liberación de ([Ca²⁺]), lo cual libera al PIP₃ y activa a la PIP-3 Cinasa, esto se comprobó con el uso de wortmanina la cual interfiere con la ruta de las proteínas cinasas C, como consecuencia se inhibió la actividad de PIP-3-cinasa (Vosseveld et al., 1997).

Se ha demostrado que la agregación del receptor Fc γ RIIA en células monocíticas mediante complejo inmune ó anticuerpo anti-receptor, da como resultado un aumento en la concentración de calcio intracelular ([Ca²⁺]) (Odin et al., 1991; Rankin et al., 1993), el fosfatidilinositol es transformado y la PLC- γ 1 es fosforilada en sus residuos de tirosina (Liao et al., 1992).

La actividad de la PI3-Cinasa se asocia con ciertas tirosinas cinasas importantes en la proliferación celular. PI-3-Cinasa cataliza la fosforilación de fosfatidilinositol, 4-fosfato (PI4-fosfato) y Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) en la posición D3 (Cantley et al., 1991), la actividad de esta enzima en las células incrementa la estimulación de receptores con actividad intrínseca de tirosina cinasa

como es el caso de receptores para factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal (EGF), la insulina, el factor estimulador de colonias (CSF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

Se sabe que al adicionar un inhibidor de tirosina cinasas a células musculares de ratón estimuladas con PDGF la enzima PI-3-Cinasa pierde actividad y por lo tanto no se genera fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂), ni tampoco sus productos fosfatidilinositol 1,4,5-trifosfato (PIP₃) y fosfatidilinositol 1,3,4,5,-tetrafosfato (PIP₄) (Auger et al., 1989). El tratamiento de células monocíticas con inhibidores de cinasas bloquea la ruta de señalización a través del receptor FcγRII, incluso la movilización de calcio, la fosforilación de tirosinas y la fagocitosis (Ghazizadeh y Fleit, 1994a).

PKC

PKC es una de las proteínas tirosina cinasa que participan en el proceso de transducción. Las isoformas de PKC dependiendo de su estructura y cofactor de regulación se dividen en 3 grupos: Las que son activadas por calcio y diacilglicerol (PKCα, PKCβI, PKCβII y PKCγ), las que son independientes de calcio pero activadas por diacilglicerol (PKCδ, PKCε, PKCη, y PKCθ) y las atípicas las cuales no requieren calcio o diacilglicerol (PKCζ, PKCλI y PKCμ). Se ha visto que la agregación del receptor FcγRI en células U937 tratadas con IFN-g (inducidas a la diferenciación) incrementa la actividad de algunas de las isoformas de PKC esencialmente las independientes de calcio como: PKCε, PKCμ, PKCλ, estas isoformas se translocan a la membrana como resultado de la activación. Ello implica que el estado de diferenciación involucra rutas de señalización diferentes a las rutas de una célula en estado de reposo (Melendez et al., 1999).

Fosforilación en células THP-1

Se ha observado que el entrecruzamiento de los receptores FcγRI y FcγRII (con los anticuerpos 32.2 y IV.3) en células THP-1 induce un rápido aumento en la fosforilación de tirosinas del rango de los 110, 80, 60 y 52 kDa (Rankin et al., 1993). Se observa una actividad máxima a los 5 minutos de entrecruzamiento de los receptores. También se ha visto que para que ocurra la fosforilación es importante la regulación a través de la fosfolipasa C, ya que al emplear herbimicina A, genisteína ó erbstatina (inhibidor de cinasas), el flujo de calcio se inhibe y con ello la fosforilación (Scholl et al., 1992).

La agregación del receptor de baja afinidad FcγRII en esta línea celular induce la activación de varias proteínas tirosina cinasas (PTK) de 160, 150, 120, 100, 75, 72, 60, 56, 46 y 40 kDa, las cuales inmunoprecipitan con el receptor el cual también resulta fosforilado (Ghazizadeh et al., 1994^a). p59^{hck} (hck) y p56^{lyn} (lyn), se ha demostrado que están presentes en células THP-1, la actividad de estas enzimas se incrementa cuando el receptor FcγRII se entrecruza. Sin embargo las enzimas hck y lyn no se encuentran asociadas al receptor de alta afinidad FcγRI

(Ghazizadeh et al., 1994b). En cambio se ha reportado un aumento en la fosforilación en proteínas de 110, 80, 60 y 52 kDa (Rankin, et al., 1993).

Por otra parte se ha visto que el entrecruzamiento de ambos receptores activa la internalización del receptor en vesículas endocíticas de 5 a 10 minutos después de la unión del ligando, este proceso es dependiente de la actividad de tirosinas cinasas (Ghazizadeh y Fleit, 1994a).

El entrecruzamiento del Fc γ RII causa la fosforilación en tirosina de la enzima PI3-Cinasa y del producto del protooncogene c-cbl (Cbl), ambos inmunoprecipitan juntos lo que sugiere una posible función de Cbl en la fagocitosis (Matsuo et al., 1996).

Se han descubierto nuevas interacciones como la asociación de Cbl con la cinasa Fyn en lisados de varios tipos celulares como la línea celular murina dependiente de Interleucina-3, 32D cl3. Debido a que Cbl se une a la proteína de fusión glutatión-s-transferasa (GST) que codifica para los dominios de homología SH2 y SH3 de las cinasas Fyn, Hck y Lyn. Esto podría indicar que Cbl es un sustrato de las cinasas de la familia Src que se activan en respuesta al entrecruzamiento de los receptores (Hunter et al., 1999). Así las cinasas de la familia Src son responsables de la fosforilación de Cbl y regulan la fosforilación de PI-3-Cinasa.

Otro de los posibles sustratos de la familia Src es p105^{CasL} (CasL), un miembro de la familia de proteínas p130cas. Lo cual se ha comprobado para el receptor de células T (TCR) y sólo para las cinasas Fyn y Lck más no ZAP-70 (Kanda et al., 1999).

Se sabe que el entrecruzamiento de los receptores Fc γ desencadena una serie de reacciones que consisten en la fosforilación de proteínas. Sin embargo las rutas de señalización no se conocen aún con detalle, por lo cual se requieren estudios más amplios sobre el tema. Basándose en las diferencias estructurales que se presentan en cada tipo de receptor es posible suponer que los patrones de fosforilación son diferentes, tanto para células indiferenciadas como inducidas a la diferenciación.

El análisis de las proteínas con actividad de tirosina cinasa que resultan del entrecruzamiento de los receptores en respuesta a la unión al anticuerpo; y el análisis de las diferencias existentes entre un estado activado y no activado de la célula a nivel de activación de proteínas nos permitirá entender mejor la función de estos receptores en la respuesta inmune.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En ciertos tipos celulares, y de manera particular en monocitos-macrófagos, existen 3 clases de receptores Fc γ R (Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII). Estos receptores tienen características estructurales y funcionales importantes tal como la unión al complejo antígeno-anticuerpo para su eliminación. Se sabe también que cuando estos receptores son activados, mediante un enlace-cruzado del receptor Fc con la fracción Fc de las IgG, se desencadena una serie de reacciones que consisten en la fosforilación de diversas proteínas por acción de las proteínas cinasas, tal proceso de señalización tiene como destino al núcleo, donde se activan genes que codifican para la síntesis de las proteínas que se requieren, ya sea para uso interno de la célula o para exportación. Dichos procesos son vitales para el funcionamiento de la célula. Sin embargo las rutas de señalización para cada uno de los Fc γ R, no se conocen aún en detalle, para lo cual se requieren estudios sobre el tema.

Proponemos que un paso importante para entender la activación de funciones efectoras a través de receptores Fc, es la caracterización detallada de los complejos de señalización ensamblados después de la agregación de los diferentes tipos de receptor y que involucran a cadenas de los receptores, cinasas y fosfatasa asociadas y los sustratos de las mismas. En especial, es importante determinar hasta qué grado una misma isoforma del receptor puede ensamblar complejos de activación diferentes, dependiendo no solamente del tipo celular, sino del estado de diferenciación/activación de la célula.

HIPOTESIS

Se sabe que el proceso de transducción de señales a través de receptores Fc involucra la fosforilación del receptor y activación de las proteínas tirosina cinasa que participan. Esta activación se lleva a cabo por medio del dominio ITAM que al ser fosforilado sirve como punto de anclaje para las tirosina cinasas. Una vez fosforiladas, estas proteínas pueden llevar a cabo diversas actividades que desembocan en el disparo de las respuestas celulares.

Suponemos que la capacidad de los receptores Fc γ R para mediar distintas funciones o bien mediar respuestas de mayor o menor magnitud, depende de su plasticidad para ensamblar distintos complejos moleculares de transducción de señales. Así la composición específica de los complejos moléculares que se forman como resultado de la agregación de los receptores Fc γ R, podría estar determinada por varios factores, entre ellos:

A) Las diferencias en la secuencia de aminoácidos del dominio ITAM existentes para cada tipo de receptor Fc, lo cual puede influir en la especificidad de interacción entre la región que contiene el ITAM y moléculas con dominio SH₂.

B) El estado de diferenciación /activación de la célula, pues esto puede influir sobre los niveles de expresión de las tirosina cinasas y/o de sus sustratos, así como de otras moléculas que pueden formar parte de los complejos de activación, como p21ras.

Por lo tanto se espera que las tirosinas cinasas que resultan activadas con la fosforilación del ITAM, sean distintas para cada uno de los receptores Fc γ , y también influirá el estado de diferenciación de la célula.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo es el de analizar las proteínas fosforiladas en tirosina que resultan activadas por la agregación de los receptores Fc γ RI y Fc γ RII. Y comparar los patrones de fosforilación en células no diferenciadas y en células inducidas a la diferenciación.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Establecer las condiciones de diferenciación de monocito a macrófago en la línea celular THP-1 evaluando:
 - Aumento en actividad de fosfatasa ácida
 - Aumento en actividad de fosfatasa alcalina
 - Fagocitosis
 - Cambio de morfología
 - Disminución de la proliferación
 - Aumento de receptores Fc γ .
- 2) Estandarizar las técnicas de estimulación de los Fc γ R, utilizando anticuerpos antireceptor y un segundo anticuerpo para inducir agregación.
- 3) Analizar proteínas fosforiladas en tirosina activadas por la agregación de los receptores Fc γ RI y Fc γ RII
- 4) Comparar los patrones de fosforilación en células no diferenciadas y en células inducidas a la diferenciación.
- 5) Establecer la relación entre el resultado de los parámetros medidos en células con tratamiento diferenciador y la activación de las tirosina cinasas.

METODOLOGIA

Cultivo Celular

Las células THP-1 se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% SFB (Gibco BRL, USA) previamente desactivado (Apéndice 1), 10 mM aminoácidos no esenciales (Sigma, Chem. USA) y 10 mM piruvato de sodio (Sigma, Chem. USA), 100 mg/ml estreptomina y 100 U/ml penicilina. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Forma scientific, USA), en atmósfera húmeda (97% de humedad relativa), al 5% de CO₂ y una temperatura de 37°C.

Inducción a la diferenciación de la línea celular THP-1

Se realizó el cultivo de células THP-1 en medio RPMI suplementado al 10 % SFB, en presencia de 1.2 y 1.6% de dimetilsulfóxido (DMSO), 2 ng, 1 ng, 500 pg, 250 pg y 125 pg/ml de M-CSF, 5 ng/ml de IL-1, 5 ng/ml de IL-6 y 100 UI/ml de IFN- γ , durante 1, 3, 5 y 7 días. Para corroborar y caracterizar la adquisición de distintas propiedades como resultado del tratamiento diferenciador se determinaron, para cada tratamiento las siguientes propiedades:

A) Cambios en la morfología: Se detectaron por observación diaria de los cultivos en un microscopio invertido (American optical, Co.USA).

B) Disminución de la proliferación celular: Se analizó por conteo del número de células presentes en el cultivo a los días 1, 3, 5 y 7 días, empleando el hemocitómetro y se estimó la viabilidad por exclusión de azul de tripano.

C) Aumento en la actividad de 3 enzimas hidrolíticas: fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y β -D-Glucuronidasa, medidas a los días 0, 1, 2 y 3.

Análisis de viabilidad.

Se llevó a cabo mediante la técnica de exclusión con azul de tripano. 10 μ l de la muestra (células resuspendidas en medio de cultivo) se mezclaron con 10 μ l del reactivo azul de tripano (Sigma, Chem. USA), se realizó el conteo del número celular de esta mezcla en una cámara de Neubauer (ó hemocitómetro) (Spencer 1/10 mm) descartando las células muertas (células teñidas de azul).

Determinación de la actividad enzimática: fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y β -D-glucuronidasa.

Células THP-1 se mantuvieron en cultivo 3 días en medio RPMI 10% SFB en presencia y ausencia de 1.2% DMSO. Se realizaron determinaciones a los días 0, 1, 2 y 3, en lisados totales y en enzima liberada al medio. Se sembraron 150,000 células/pozo en placas de 96 micropozos de 200 μ l (Nuncion, Dinamarca), resuspendidas en 100 μ l de Hanks completo (Apéndice 1), sin y con estímulo [10 μ M Forbol miristato (Sigma, Chem. USA)] para medir enzima liberada y sin estímulo para medir enzima en lisados totales, se incubó durante 2 horas a 37°C, 5% de CO₂, atmósfera húmeda. Al cabo de 2 horas, a

las células destinadas a ser lisadas se les adicionó tritón (Sigma, Chem. USA) para una concentración final de 1% y se incubó 10 min. Las células se centrifugaron en una centrifuga de placas (Hermle GmbH, Alemania), posteriormente se tomaron 45 μ l del sobrenadante del lisado total o de enzima liberada y se incubaron con 100 μ l de sustrato para fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina ó β -D-glucuronidasa (Apéndice 1) según la determinación. Se incubó 90 minutos para las fosfatasas y 120 minutos para β -D-glucuronidasa, a 37°C y se cuantificó la actividad en un lector de placas (Bio-tec Instruments, Inc. ELx800) a una longitud de onda de 405 nm. Previamente la reacción se detuvo con 100 μ l 2N NaOH (Sigma, Chem. USA) para las fosfatasas y 100 μ l 0.2 M de NaOH para β -D-glucuronidasa.

Determinación de proteínas por el método de Lowry

Estas determinaciones se hicieron para equilibrar las cantidades de proteína que se utilizaron en los ensayos enzimáticos, pues se requiere colocar cantidades iguales de proteína en cada uno de los pozos y poder establecer la comparación entre células no tratadas y células inducidas a la diferenciación. Se realizó empleando un Kit de Bio-Rad (Lowry modificado) para determinación de proteínas en detergente, colocando 5 μ l de los lisados problema (cels. THP-1, lisadas con 1% de tritón) en placas de 96 pozos, cada muestra por triplicado. A los lisados se adicionó 25 μ l de la solución de trabajo (20 μ l de reactivo "S" por 1 μ l de reactivo "A") y 200 μ l del reactivo "B". Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió la actividad en un lector de placas a una longitud de onda de 750 nm (650-750 nm).

Inmunofluorescencia indirecta

1 millón de células THP-1 se lavaron 1 vez con medio MEM, se resuspendieron en buffer de lavados (Apéndice 1), se colocaron en tubos para FACS en hielo, se incubaron con 10 μ g del anticuerpo primario (IV.3 y 32.2) durante 90 minutos. Se usaron como controles células solas, y células con IgG1 kappa, el cual es un isotipo del anticuerpo 32.2 (Sigma, Chem. USA). Las muestras se lavaron 2 veces con 1 ml de buffer de lavados. Se incubó con un segundo anticuerpo conjugado con biotina dilución 1:100 durante 1 hora. Se lavó 2 veces con buffer de lavados. Se agregó streptavidina fluoresceinada (Sigma, Chem. USA) dilución 2:100, se incubó una hora en obscuridad. Se lavó 2 veces con buffer de lavados y una vez con PBS. Se incubó con paraformaldehído al 1% (Apéndice 1) durante 25 minutos. Se lavó 2 veces con PBS y se resuspendió en 1 ml de PBS. Las muestras se analizaron en un Facscan. Se analizaron las gráficas obtenidas.

Estimulación de receptores Fc γ R

20 millones de células se incubaron durante 10 min a 4°C en 1 ml de medio RPMI 3% SFB, después de ese tiempo se estimularon con 10 μ g/ml de

anticuerpo específico para Fc γ RI (32.2) ó Fc γ RII (IV.3) durante 10 min a 4°C, se lavaron una vez con 1 ml de medio RPMI 3% SFB a 3000 r.p.m. en una microcentrífuga (Gerälebau Eppendorf, Germany). Posteriormente se indujo la agregación de los receptores con 100 μ g/ml de anticuerpo conejo anti-IgG de ratón (Sigma, Chem. USA) durante 5 min a 37°C. Para terminar la reacción de fosforilación, las células se lavaron rápidamente con 500 μ l de medio RPMI frío, se agregaron 500 μ l de buffer de lisis y se incubó a 4°C durante 15 min. El lisado se centrifugó para eliminar restos celulares a 13,000 r.p.m. durante 10 min. a 4 °C.

Análisis de proteínas fosforiladas en tirosina inducidas por la agregación de los receptores Fc en lisados totales

Para retirar el DNA y residuos celulares se centrifugaron las muestras a 13,000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C. Al sobrenadante resultante se le adicionaron 2 volúmenes de acetona fría (J.T.Baker, México) y se incubó toda la noche a 4°C, para lograr la precipitación de las proteínas. Al día siguiente se centrifugaron las muestras a 13,000 r.p.m. durante 30 minutos a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado, el cual contenía además de las proteínas intracelulares, desechos como restos de DNA y lípidos, para eliminarlos se lavó la muestra 5 veces con acetona fría, se eliminó la acetona restante en el Speed-vac (Savant Instruments Inc, Germany). El precipitado obtenido se resuspendió en 20 μ l de buffer de Laemmli (Apéndice 1) y 2 μ l de 1M Ditiotreitól (DTT) (Sigma, Chem. USA), Las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE en un gel 10% (Apéndice 1); posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se realizó un inmunoblot utilizando anticuerpos anti-fosfotirosina. Los anticuerpos primarios se detectaron con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina (Ver técnica de Western-Blot).

Inmunoprecipitación

Células THP-1 en cultivo, inducidas y sin inducir a la diferenciación, se estimularon para inducir a la agregación de los receptores (como se describe arriba), posteriormente se lavaron con medio RPMI sin suero fetal de bovino, se les adicionó 1 ml de buffer de lisis (Apéndice 1), se incubó 15 min. a 4°C, posteriormente se centrifugaron los lisados a 13,000 r.p.m. durante 10 min. a 4°C para eliminar desechos celulares. El sobrenadante en el cual estaban contenidas las proteínas celulares se incubó toda la noche a 4°C con 20 μ l de proteína A-sefarosa acopladas al anticuerpo específico anti-receptor (Apéndice 1). Al día siguiente el inmunoprecipitado se lavó 5 veces con 500 μ l de buffer de lavado de inmunoprecipitación (Apéndice 1), se retiró todo el buffer de lavado y se adicionaron 20 μ l de buffer de Laemmli y 2 μ l de 1 M Ditiotreitól (DTT).

Las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE al 10%, posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se realizó un inmunoblot utilizando anticuerpos anti-Fc γ RI (32.2), anti-Fc γ RII (IV.3) ó anti-

fosfotirosina. Los anticuerpos primarios se detectaron con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina (Ver técnica de Western-Blot).

Electroforesis.

La separación de las proteínas se llevo a cabo por la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). El detergente SDS (dodecil-sulfato de sodio) confiere carga negativa a los complejos resultantes, rompe los enlaces no covalentes de las proteínas provocando que las moléculas pierdan su conformación, pues es un agente reductor de enlaces disulfuro. Se preparo un gel 10% de acrilamida para el gel separador y 4% para el gel concentrador (Apéndice 1). Las muestras de proteínas se hirvieron en 20 μ l de buffer de Laemmli y 2 μ l de 0.1 M ditioneitol (DTT) durante 5 minutos. La electroforesis se realizó a 100 volts en buffer de corrida (Apéndice 1) durante 1.5 hrs.

Western blot.

Posteriormente se llevó a cabo la electrotransferencia (Western blot), para identificar proteínas específicas mediante el uso de anticuerpos dirigidos. La transferencia se logra humedeciendo el sandwich papel-membrana-gel en buffer de transferencia (Apéndice 1), este sandwich se colocó entre los platos electrodos de carbón durante 1.5 hrs a 120 miliamperes. La transferencia de proteínas se verificó por tinción de la membrana con solución de rojo Ponceau (Sigma Chem, USA). Las regiones donde no hay proteínas, se bloquearon con 5% leche (Svelty Nestle, México) en TBS (Apéndice 1) durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente la membrana se lavó con TBS-Tween-20 (Sigma, Che. USA) 2 veces antes de las incubaciones con anticuerpos. La membrana se incubó con 3 μ g de anticuerpo primario ratón anti-FcyRI (32.2), anti-FcyRII (IV.3) ó una dilución 1:2500 de anticuerpo anti-fosfotirosina (Sigma Chem, USA) en leche-TBS-0.1% Tween durante 2 horas. Al término de la incubación se lavó 5 veces con TBS-Tween, cada lavado de 5 minutos y se incubó con el anticuerpo secundario conejo anti-ratón (Sigma Chem, USA) durante 1 hora (dilución 1:4000) en leche-TBS-0.1% Tween, se realizaron nuevamente 5 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-0.1% Tween. Finalmente se incubó con un 3er anticuerpo chivo anti-conejo (Sigma Chem, USA) el cual está conjugado con la enzima fosfatasa alcalina, la cual en presencia de su sustrato [1.65 mg de Nitroazul de tetrazolio (Sigma Chem, USA) y 0.82 mg de 5-Bromo-4-Cloro-3-indolil-fosfato (Sigma Chem, USA)] produce un precipitado coloreado que corresponde a las proteínas específicas reconocidas por el anticuerpo primario.

RESULTADOS

Evaluación de la disminución de la proliferación de la línea celular THP-1.

Con la finalidad de analizar los patrones de fosforilación obtenidos en células THP-1 indiferenciadas e inducidas a la diferenciación, se establecieron condiciones de diferenciación para esta línea celular. Se empleó el Dimetilsulfóxido (DMSO) que es un agente diferenciador de células del linaje mielóide, como es el caso de la línea THP-1 (Collins et al., 1979; Koeffler, 1983; Takeda et al., 1982).

Se evaluaron parámetros propios de la diferenciación para células mieloides, como disminución de la proliferación, aumento de la actividad de enzimas como fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y β -D-glucuronidasa, cambios morfológicos y aumento en la expresión de receptores Fc γ RI y Fc γ RII, para lo cuál se sembraron células de la línea THP-1 y se incubaron en presencia de DMSO, para inducir la diferenciación de las células de monocito a macrófago.

Para encontrar la concentración ideal de DMSO a utilizar, se probaron 2 de las citadas en la literatura, 1.2 y 1.6% (Takeda, et al., 1982) las cuales eran las más altas sin llegar a ser tóxicas, además de tener un mayor efecto sobre líneas mieloides, tal como la línea THP-1.

Se realizaron cinéticas de proliferación seguidas durante 7 días. La disminución de la proliferación se evaluó mediante conteo celular y se estimó la viabilidad celular por exclusión de azul de tripano en células tanto en suspensión como adheridas.

Se sembraron 80,000 células en placas de 96 pozos y se incubaron en presencia de 1.2% y 1.6% de DMSO, durante 7 días. Se observó que al emplear la concentración de 1.6% se adhería un mayor número de células al tercer día pero también había más muerte celular, razón por la cual se empleó la concentración de 1.2% para el resto de los experimentos donde la viabilidad celular era de aproximadamente 80%.

Posteriormente se realizaron cinéticas de proliferación sembrando 50000 células en 2.5 ml. de medio, en presencia y ausencia de DMSO, con lo cual se obtuvieron mejores resultados. En el caso de células en suspensión la proliferación celular se detuvo a partir del tercer día, se obtuvo una diferencia significativa al séptimo día del tratamiento con respecto a las células no tratadas las cuáles continuaron proliferando de manera exponencial (**Gráfica 1**). En el análisis estadístico para dos varianzas con un riesgo de 0.01, la varianza de los datos de células sin DMSO (Datos 1) fue de 3.1101E+12 y para los datos de las células con DMSO (Datos 2) fue de 4.5377E+10; fue positiva la hipótesis alterna $H_1: \sigma^2_1 \neq \sigma^2_2$, con una F de Snedecor de 68.5393 y una F de tablas de 15.9770. Con respecto a las células adherentes tratadas con DMSO éstas mantuvieron aproximadamente el mismo número al paso de los días, pues una vez iniciado el proceso de diferenciación las células ya no proliferan (**Gráfica 2**), se obtuvo también una diferencia significativa en una prueba de hipótesis para dos varianzas para datos 1 (sin tratamiento) la varianza fue de 3.6825E +10, y para datos 2 (con

DMSO) la varianza fue de 1113498251; fue aceptada la hipótesis: $\sigma^2_1 \neq \sigma^2_2$, con una F de Snedecor de 330.717261 y una F de tablas de 15.977093.

Evaluación de morfología de células inducidas a la diferenciación con DMSO.

Los cambios morfológicos se evaluaron cualitativamente por observación directa de las células al microscopio invertido. Fue evidente que al tercer día las células mostraban una morfología diferente a la de las células sin estímulo, esto es células más extendidas, adheridas al sustrato, con mayor tamaño lo que indica que posiblemente estaban en proceso de diferenciación (**Figura 7**).

El hecho de encontrar un mayor número de células en ausencia de DMSO, indica que las células están proliferando, pues no hay un agente que interfiera en el ciclo de división celular; en cambio en presencia de DMSO la división es menor, ya que al iniciarse el proceso de diferenciación cambian las funciones celulares, deteniéndose la división de la célula para incrementar las funciones metabólicas propias de una célula diferenciada, tales como la capacidad fagocítica, aumento en el estallido respiratorio, disminución de su proliferación, etc.

Sin embargo, para realizar una evaluación cuantitativa se requiere sembrar células de manera adecuada para que sean teñidas y cuantificar a las células con cambios morfológicos, y además utilizar técnicas de tinción específicas para determinar el tipo de célula diferenciada que está induciendo el DMSO.

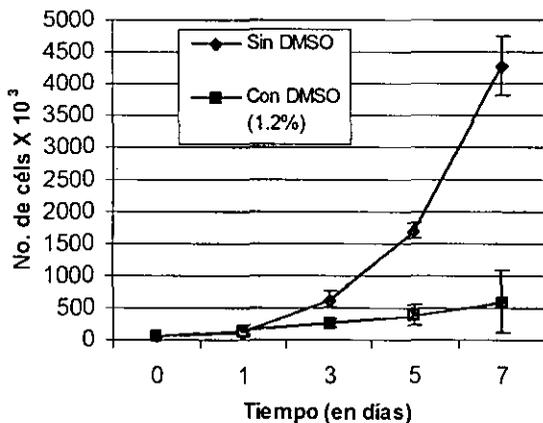
Evaluación de la actividad de las enzimas fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y β -D-Glucuronidasa como indicadores de diferenciación

Otro de los marcadores de diferenciación es el aumento en la actividad enzimática, por ello se cuantificó el incremento en la actividad de fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y β -D-Glucuronidasa. Se sembraron 150 000 células/pozo, en ausencia y en presencia de 1.2% de DMSO. Las células se incubaron en solución de Hanks completo y se evaluó la cantidad de enzima liberada durante 2 hrs, así como la enzima total de las células (lisados celulares) para luego hacerla reaccionar con su sustrato.

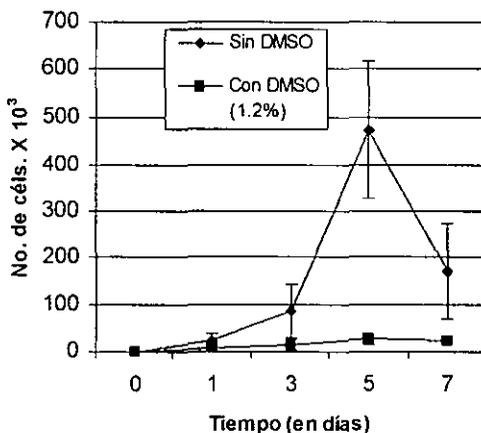
Fue necesario estandarizar la cantidad de proteína que se colocaba por pozo en estos ensayos, pues de lo contrario se obtenían datos erróneos, debido a que el conteo celular no era suficiente.

Se detectó aumento en la actividad enzimática en la línea celular THP-I, siendo la enzima fosfatasa ácida la que presentó una mayor actividad. Las determinaciones se hicieron de 1 a 3 días de cultivo en presencia y ausencia del agente diferenciador, este lapso de tiempo parece ser suficiente para que la mayor parte de las células en cultivo logren diferenciarse. El patrón de comportamiento observado para cada una de las enzimas es similar y cambia al inducir a la diferenciación con respecto al de las células no diferenciadas.

Al determinar la cantidad de enzima fosfatasa ácida liberada al medio, y haciendo lisado total (**Gráfica 3**), se observa una mayor cantidad de enzima en las células inducidas a la diferenciación con DMSO con respecto a células indiferenciadas, se observa además que a partir del día 2 la actividad de la enzima se incrementa en las células tratadas con DMSO.



Gráfica 1. Efectos dependientes de la concentración de DMSO y el tiempo en la proliferación de células THP-1. Se sembraron 50,000 céls./pozo en presencia y ausencia de 1.2% de DMSO durante 7 días. Se evaluó la cinética de proliferación celular, considerando células en suspensión viables. La viabilidad se determinó por exclusión con azul de tripano. Como control se utilizaron células sin estímulo.



Gráfica 2 Efectos dependientes de la concentración de DMSO y el tiempo en la proliferación de células THP-1. Se sembraron 50,000 céls./pozo en presencia de 1.2% de DMSO durante 7 días. Se evaluó la cinética de proliferación celular, considerando células adheridas al sustrato viables. La viabilidad se determinó por exclusión con azul de tripano. Como control se utilizaron células sin estímulo.

Al analizar el comportamiento de la enzima fosfatasa alcalina liberada al medio y en lisados totales (**Gráfica 4**) se obtiene que no hay una diferencia significativa entre células tratadas con DMSO y células sin tratamiento. Sin embargo, puede apreciarse que al igual que las otras 2 enzimas las células tratadas con DMSO resultan tener una mayor actividad con respecto a las células no tratadas.

La enzima β -D-glucuronidasa también se incrementa al ser expuesta al DMSO con respecto a células sin tratamiento (**Gráfica 5**), esto se midió en lisados totales sin embargo el análisis estadístico para dos varianzas muestra que no hay diferencia significativa en las tres enzimas evaluadas (ver tablas de análisis estadístico, **Apéndice 2**).

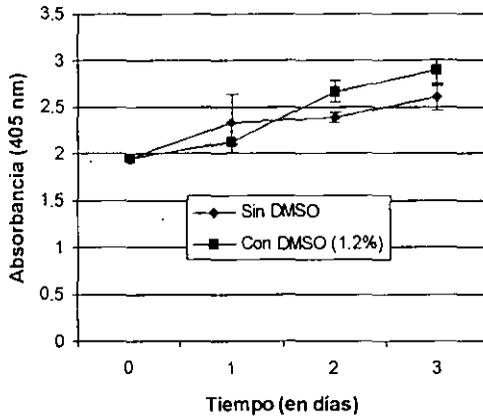
Evaluación del incremento en el número de receptores Fc γ como indicador de diferenciación

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta con el fin de analizar el aumento de receptores Fc γ RI (**Gráfica 6a**) y Fc γ RII (**Gráfica 6b**) en células inducidas a la diferenciación y células sin tratamiento. No se encontró ninguna diferencia entre los tratamientos, lo cual nos indica que el número de receptores Fc γ RI y Fc γ RII no se incrementó con el tratamiento de diferenciación.

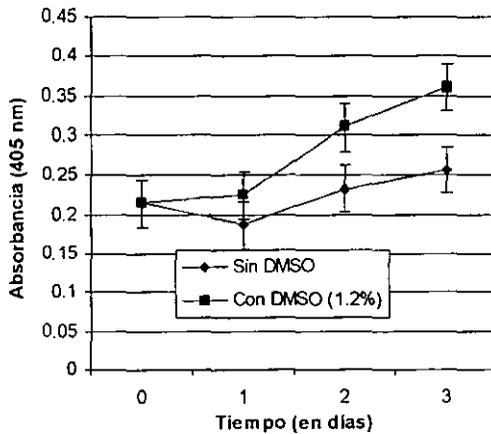
Efecto de diferentes agentes inductores de la diferenciación

Por otro lado, también se probaron distintas concentraciones de Lipopolisacárido bacteriano (LPS), en células THP-1 con la finalidad de inducir las a la diferenciación, pues se han reportado diversos efectos sobre la función de las células inmunes en general, y macrófagos en particular; los eventos moleculares intracelulares que media el LPS no son claros. Se sabe que LPS es un activador de macrófagos, razón por la cual podría pensarse que interviene en el proceso de diferenciación. Se probaron varias concentraciones y se evaluó proliferación celular los días 1, 3, 5 y 7 (**Gráfica 7**). No se observó el efecto esperado, pues en ninguna de las concentraciones empleadas las células detuvieron su proliferación de manera significativa, aunque en el rango de concentraciones de 0.1 a 6.4 μ g/ml disminuyó la proliferación celular.

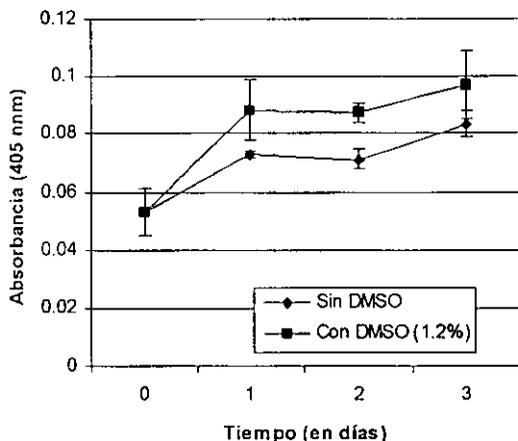
Asimismo se sabe que distintas citocinas, tales como el M-CSF, el IFN- γ , la IL-1 y la IL-6; intervienen en el proceso de hematopoyesis. Las dos interleucinas juegan un papel importante en la maduración de monocitos normales hacia macrófagos, el interferón- γ , y el M-CSF también intervienen en la maduración de células del linaje mieloide pero lo hacen en estadios anteriores a las interleucinas 1 y 6. Los resultados de la incubación de células THP-1, en presencia de IL-1, IL-6, IFN- γ (**Gráfica 8a**) y M-CSF (**Gráfica 8b**) muestran que estas citocinas no ejercieron efecto alguno sobre las células, esto se observó al evaluar la proliferación de las células a los 5 días de cultivo.



Gráfica 3. Determinación de la actividad de fosfatasa ácida en células THP-1 indiferenciadas e inducidas a la diferenciación con 1.2% de DMSO durante 3 días. Se sembraron 150000 céls/pozo , se incubaron durante 2 horas en hanks completo; se evaluó la enzima liberada al medio lisando a las células. El lisado se incubó con 4.5 mM p-nitrofenilfosfato en buffer de acetato de sodio como sustrato durante 2 horas, se leyó la absorbancia a 405 nm.



Gráfica 4. Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina en células THP-1 indiferenciadas e inducidas a la diferenciación con 1.2% de DMSO durante 3 días. Se sembraron 150000 céls/pozo , se incubaron durante 2 horas; la enzima liberada se evaluó lisando las células al término de este tiempo e incubando con 4.5 mM p-nitrofenilfosfato en buffer de dietanolamina como sustrato durante 2 horas, se leyó la absorbancia a 405 nm.



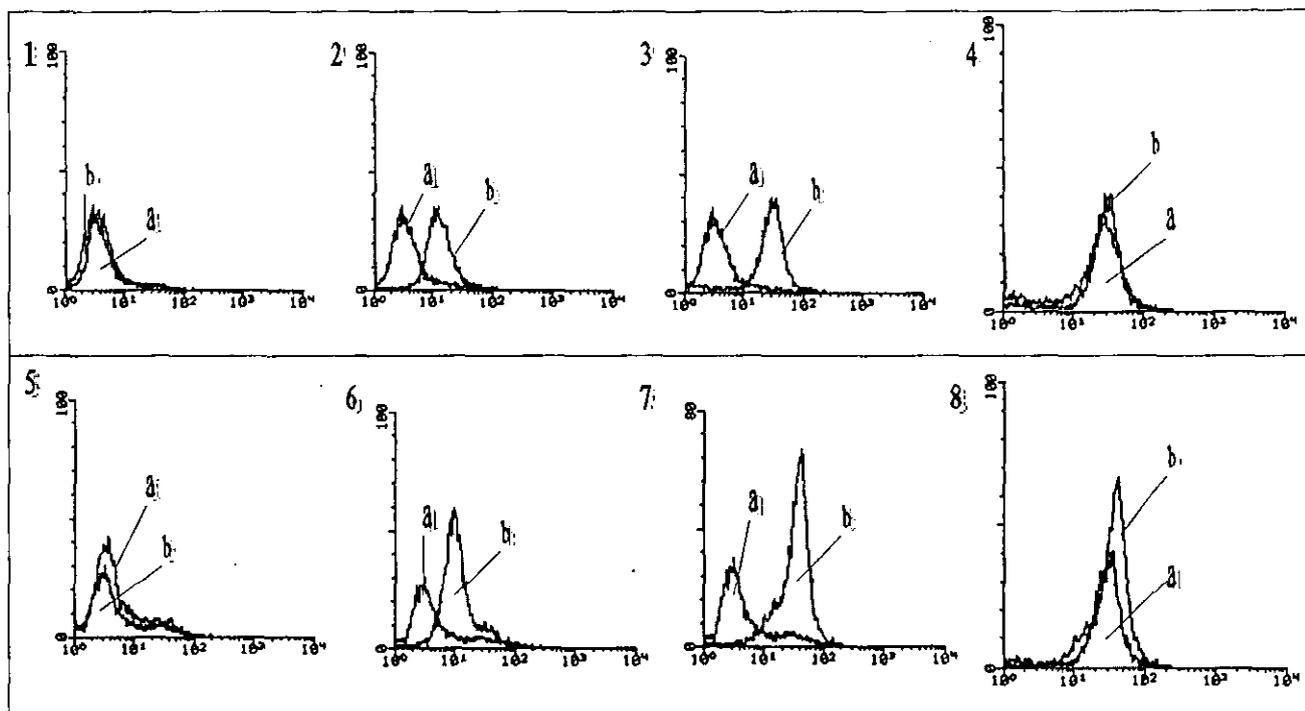
Gráfica 5. Determinación de la actividad de β -D-Glucuronidasa en células THP-1 indiferenciadas e inducidas a la diferenciación con 1.2% de DMSO durante 3 días. Se sembraron 150000 céls/pozo, se incubaron durante 2 horas; la enzima liberada se evaluó lisando las células al término de este tiempo e incubando con : 0.01 M de p-nitrophenyl β -D-Glucuronido como sustrato durante 2 horas, se leyó la absorbancia a 405 nm.

Detección de proteínas fosforiladas en tirosina en células sin diferenciar e inducidas a la diferenciación

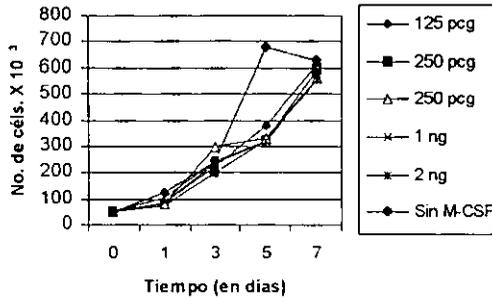
Una vez determinadas las condiciones de diferenciación de las células THP-1 se procedió a detectar el estado de fosforilación en tirosina de diferentes proteínas, tanto en células no diferenciadas como en células inducidas a la diferenciación, puesto que está bien documentada la participación de las proteínas tirosina cinasas en los procesos de señalización.

Se realizó el análisis de proteínas en lisados totales, en este caso se observaron gran cantidad de proteínas que incluyen proteínas citoplasmáticas y otras unidas a la membrana como es el caso de los complejos unidos a los receptores Fc (**Figura 8**).

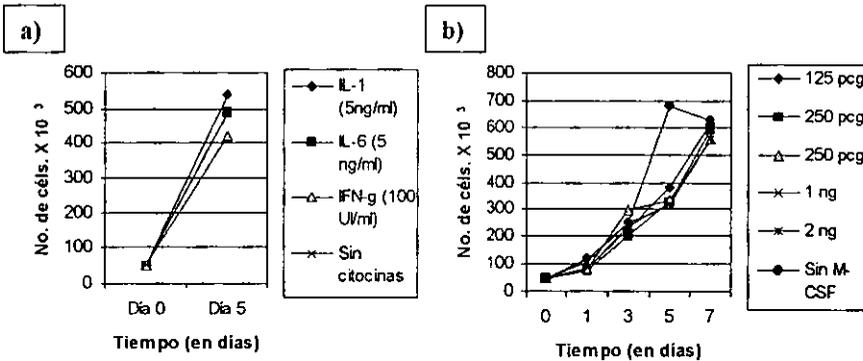
Se realizaron estimulaciones en la línea celular THP-1 con los anticuerpos monoclonales mAb32.2, y mAbIV.3, posteriormente se indujo a la agregación de los receptores con un segundo anticuerpo, se lisaron las células y se precipitaron las proteínas; se separaron por electroforesis SDS-PAGE, se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos anti-fosfotirosina. Lo anterior se hizo en células sin diferenciar y en células inducidas a la diferenciación con DMSO.



Gráfica 6. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Se incubaron células THP-1 en presencia y ausencia de 1.2% DMSO durante 3 días, 1×10^6 células se incubaron con anticuerpos primarios (anti-Fc γ RI y anti-Fc γ RII), después con un segundo anticuerpo conjugado con biotina y finalmente con estreptavidina fluoresceinada donde: Fc γ RI sin DMSO (2b) y con 1.2% DMSO (3b) y anti-Fc γ RII sin DMSO (6b) y con DMSO (7b). Se utilizaron como control de isotipo IgG1 kappa (1a y 5a) y anticuerpo secundario (1b y 5b). En las gráficas 2, 3, 6 y 7 aparecen a la izquierda los controles negativos solo con anticuerpo 2 $^{\circ}$ (letra a). En la gráfica 4 aparece Fc γ RI sin tratamiento (4a) y con tratamiento (4b) y en la gráfica 8 aparece Fc γ RI sin tratamiento (8a) y con tratamiento (8b) Las muestras se leyeron en un FacScan.



Gráfica 7. Efectos dependientes de la concentración de Lipopolisacárido (LPS) y el tiempo en la proliferación de células THP-1. Se sembraron 300000 céls./pozo en presencia y ausencia de 0.012, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 y 6.4 $\mu\text{g/ml}$ durante 7 días. Se evaluó la cinética de proliferación celular, considerando células en suspensión viables. La viabilidad se determinó por exclusión con azul de tripano. Como control se utilizaron células sin estímulo.



Gráfica 8. Efectos dependientes de la concentración de (a) IL-1, IL-6, IFN- γ , y (b) M-CSF en la proliferación de células THP-1. Se sembraron 50000 céls./pozo en presencia y ausencia de: a) 5 ng/ml de IL-1, IL-6 y 100 UI/ml de IFN- γ , durante 5 días; b) 125, 250, 500 picogramos, 1 y 2 nanogramos de M-CSF durante 7 días. Se evaluó la cinética de proliferación celular, considerando células en suspensión viables. La viabilidad se determinó por exclusión con azul de tripano. Como control se utilizaron células sin estímulo.

Al realizar el corrimiento electroforético del lisado total en gel de poliacrilamida, teñido posteriormente con azul de Coomassie, se observa una gran cantidad de proteínas (Figura 8); sin embargo al realizar el inmunoblot e incubar con el anticuerpo anti-fosfotirosina, se observa que no todas las proteínas se fosforilan (Figura 9).

Se analizó por Western-blot el cambio en la formación de los complejos moleculares a través del paso de los días. Para esto se hicieron estimulaciones con anticuerpos anti-receptor Fc en células sin inducir a la diferenciación y células tratadas con DMSO durante 1, 3, y 5 días, con esto pudimos observar algunos de los cambios que pueden estar ocurriendo durante el proceso de diferenciación.

En el inmunoblot (**Figura 9**) se observa en general que en células que han sido estimuladas con los anticuerpos 32.2 y IV.3 hay un mayor grado de fosforilación con respecto a las células control, esto se observa a los días 1, 3 y 5, tanto en células sin tratamiento como inducidas a la diferenciación.

Pueden observarse diferencias notorias en el patrón de fosforilación de proteínas para células no diferenciadas, con respecto al patrón de células diferenciadas, pues al primer día observamos la activación de gran número de cinasas de aproximadamente 26, 28, 50, 54, 57, 83 y 98 kDa. Al tercer día se activo un menor número de cinasas en respuesta al entrecruzamiento, se observan las cinasas de aprox. 50 y 83 kDa. Al quinto día el patrón de activación es mucho más específico que al día uno, la proteína de 50 kDa es prácticamente la única proteína fosforilada al entrecruzar al receptor Fc γ RI en células tratadas con DMSO, y en el caso del receptor Fc γ RII en células tratadas, se activan las cinasas de aprox. 55, 64, 72 y 92 kDa. Para células no tratadas sólo se activan las cinasas de 55 y 64 kDa, y lo hacen en menor proporción.

Son evidentes los cambios en los patrones de fosforilación que corresponden a cada uno de los días analizados, principalmente en una proteína de aproximadamente 50 kDa en la cual varía el grado de fosforilación con el transcurso del tiempo, su fosforilación se incrementa al quinto día de tratamiento en células inducidas a la diferenciación.

Cabe señalar que el patrón de fosforilación entre células estimuladas con el anticuerpo IV.3 y 32.2 es similar al primer día de tratamiento y varía ligeramente al tercer día con respecto al control (células sin estimular), sin embargo es al quinto día de tratamiento cuando las diferencias entre los patrones de fosforilación correspondientes a cada uno de los receptores se hacen mas evidentes.

El análisis de proteínas fosforiladas en tirosina en lisados totales, también se realizó en células THP-1 incubadas con Forbol ester miristato (TPA) a una concentración 10 μ M, durante 5 días (**Figura 10**); éste es un agente diferenciador reportado ampliamente en la bibliografía para esta línea celular (Suematsu et al., 1995). Al analizar el lisado mediante inmunoblot, incubando con anticuerpos anti-fosfotirosina, pudieron observarse similitudes en los patrones de fosforilación al quinto día de tratamiento en células incubadas con DMSO y tratadas con TPA, tales como el aumento en la fosforilación de una proteína de aproximadamente 50 kDa en células tratadas con ambos agentes.

Detección de proteínas fosforiladas en tirosina mediante inmunoprecipitación

Posteriormente, se llevaron a cabo inmunoprecipitaciones de los receptores Fc γ RI y Fc γ RII con el fin de analizar sólo a las cinasas de tirosina que estuvieran unidas al receptor formando un complejo de señalización. Este es un sistema más

limpio y específico, que nos permite tener mas seguridad y control sobre las proteínas cinasas que se están buscando, en este caso de los complejos que participan en la ruta de señales.

Se realizaron estimulaciones con los anticuerpos IV.3 y 32.2 en células THP-1 sin tratamiento e inducidas a la diferenciación durante 3 días, periodo en el cual ya se estaba dando el proceso de diferenciación. Las células fueron lisadas y el lisado se incubó, con esferas de proteína A-Sefarosa acopladas al anticuerpo anti-receptor, durante toda la noche a 4°C; el inmunoprecipitado se separó mediante electroforesis SDS-PAGE y se realizó un inmunoblot con anticuerpos anti-receptor con el fin de comprobar la inmunoprecipitación de ambos receptores. En la **Figura 11 a**, puede observarse la proteína de aproximadamente 72 kDa que corresponden al receptor FcγRI, tanto en células sin tratamiento como en células tratadas, notándose un ligero aumento en la fosforilación en células tratadas. De igual forma, puede observarse la proteína de aproximadamente 40 kDa que corresponde al receptor FcγRII para células no tratadas y con tratamiento (**Figura 11 b**). Se observan las cadenas pesada y ligera de los anti-receptor utilizados para inmunoprecipitar.

Con la finalidad de analizar los complejos moleculares ensamblados con cada uno de los receptores a través del dominio ITAM, se utilizó el mismo procedimiento mediante el cual se detectó la presencia de ambos receptores, pero realizando un inmunoblot con anticuerpos anti-fosfotirosina. Se detectaron diferentes moléculas unidas a cada uno de los receptores. Con el receptor FcγRI coprecipitaron 4 proteínas, (**Figura 12**), de aproximadamente 57, 64, 80 y 94 kDa; estas mismas proteínas coprecipitan en células no estimuladas y en células inducidas a la diferenciación, observándose una disminución en la fosforilación en células inducidas a la diferenciación con DMSO, con excepción de la proteína de 80 kDa en la cual aumentó la fosforilación. En el caso del receptor FcγRII coprecipitaron 6 proteínas fosforiladas en tirosina (**Figura 12**) de aproximadamente 40, 48, 64, 72, 97 y 168 kDa, estas proteínas también se encuentran en células inducidas a la diferenciación, pero contrariamente a lo que sucedió con el receptor FcγRI, la fosforilación se incremento principalmente en las proteínas de 64, 72 y 168 kDa.

Esto indica que existen diferencias en el patrón de fosforilación de células inducidas a la diferenciación y células sin diferenciar así como entre ambos receptores. La estimulación con el mAbIV.3 produce un patrón de fosforilación diferente al de células control y al de las células estimuladas con el anticuerpo 32.2.

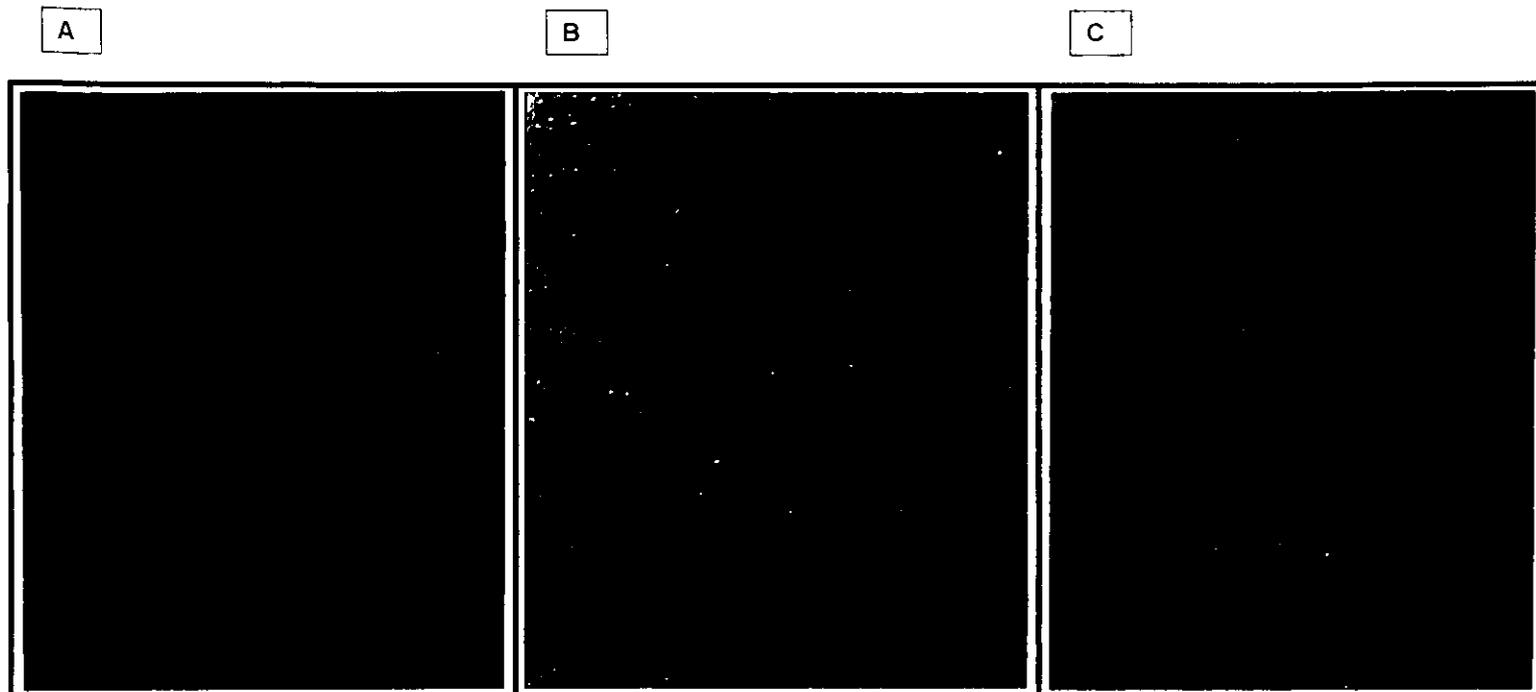


Figura 7. Células THP-1 en cultivo celular tratadas durante 3 días en presencia y ausencia de 1.2% de DMSO. A) Células sin tratamiento, se observa la agrupación de colonias en forma de racimo característica de la línea celular en condiciones de crecimiento normal. B) Células en presencia de 1.2% de DMSO durante 3 días, se observa la dispersión de las colonias, C) Células con el mismo tratamiento durante 7 días se observa como las células se fijan al sustrato, algunas presentan proyecciones del propio citoplasma al inducir a la diferenciación.

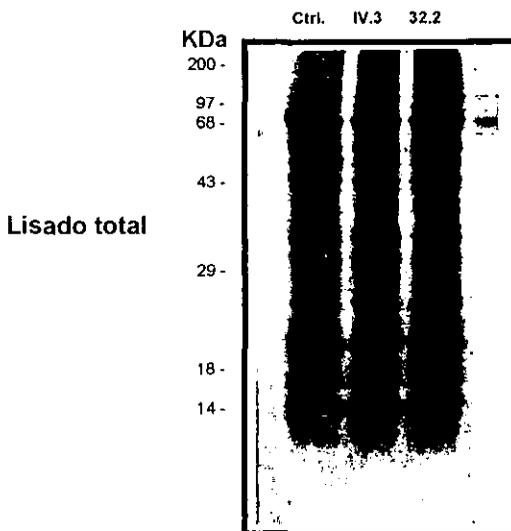


Figura 8. Células THP-1, indiferenciadas, se estimularon con los anticuerpos 32.2 (anti Fc γ RI) y IV.3 (anti Fc γ RII), se lisaron, se separaron las proteínas en un gel SDS-PAGE 12.5% el cual se tiñó con azul de Coomassie. Se indican los marcadores de peso molecular en kDa.

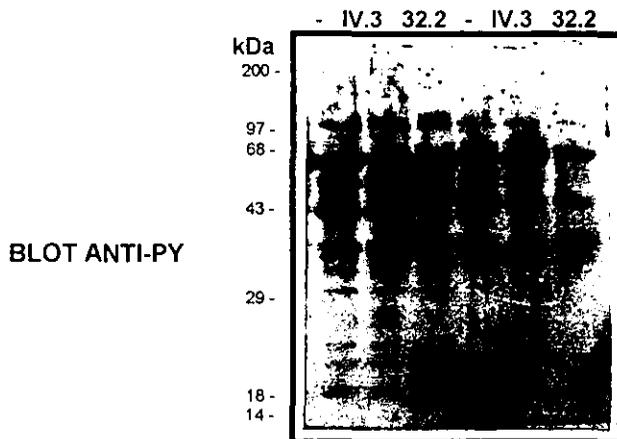


Figura 10. Células THP-1 fueron inducidas a la diferenciación durante 5 días con 10 μ M TPA (Forbol ester miristato), se entrecruzaron los receptores Fc uniendo un anticuerpo anti-receptor (generado en ratón), posteriormente se realizó la estimulación con un segundo anticuerpo (ratón anti-conejo) durante 5 minutos, las células se lisaron las células con buffer de lisis, las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se realizó un western-blot incubando con anticuerpos anti-fosfotirosina, los cuales se detectaron con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina. Los marcadores de peso molecular se indican en kilodaltones.

Blot anti-fosfotirosina

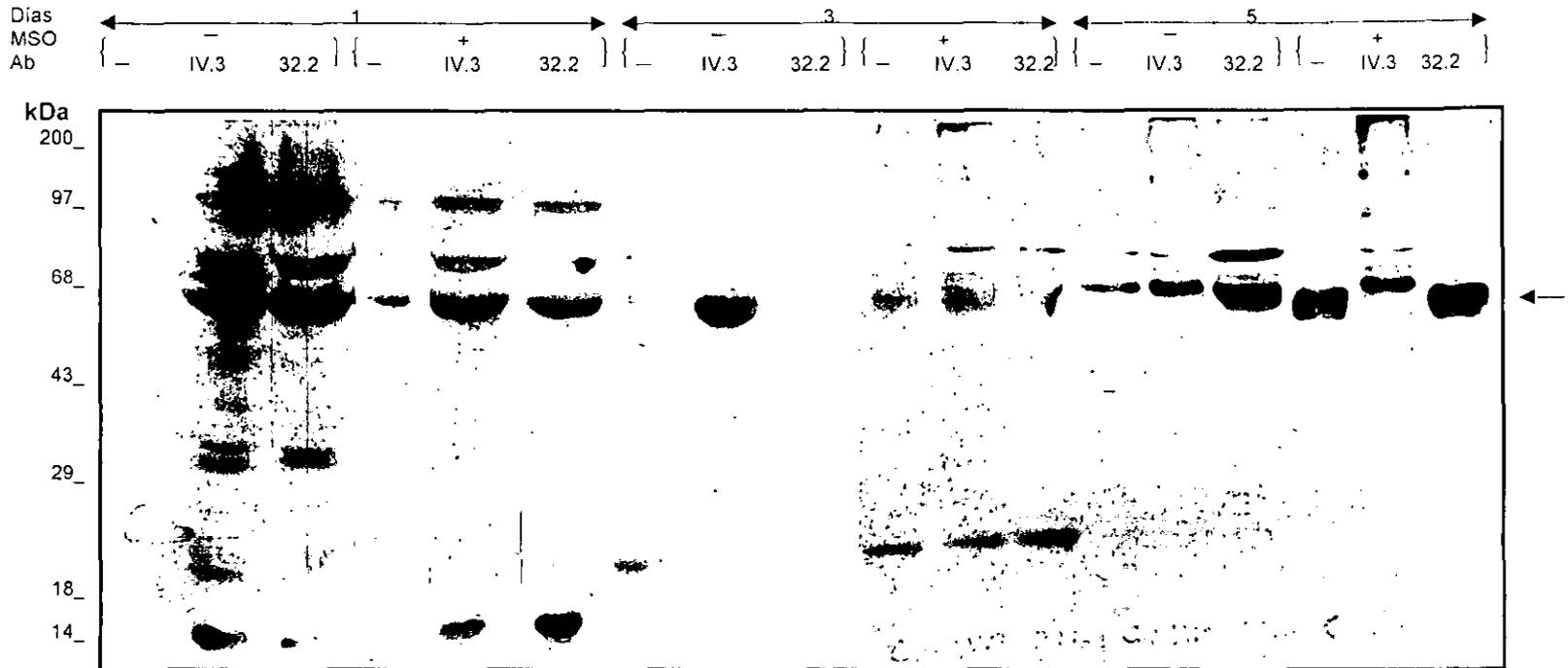


Figura 9. Se sembraron células THP-1 en presencia y ausencia de 1.2% Dimetilsulfoxido (DMSO) durante 1, 3 y 5 días en medio Iscove's suplementado al 10% con S.F.B., en atmósfera húmeda, 5% de CO₂ y a 37° C. Se entrecruzaron los receptores Fc uniendo un anticuerpo anti-receptor (generado en ratón) y después un segundo anticuerpo (ratón anti-conejo), se lisaron las células con buffer de lisis, las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se realizó un western-blot incubando con anticuerpos anti-fosfotirosina, los cuales se detectaron con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina. Los marcadores de peso molecular se indican en kilodaltones.

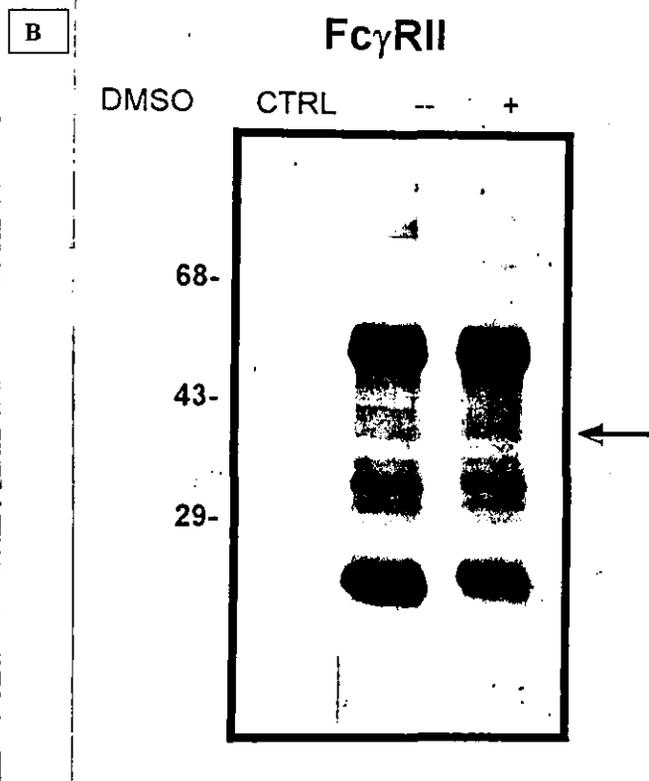
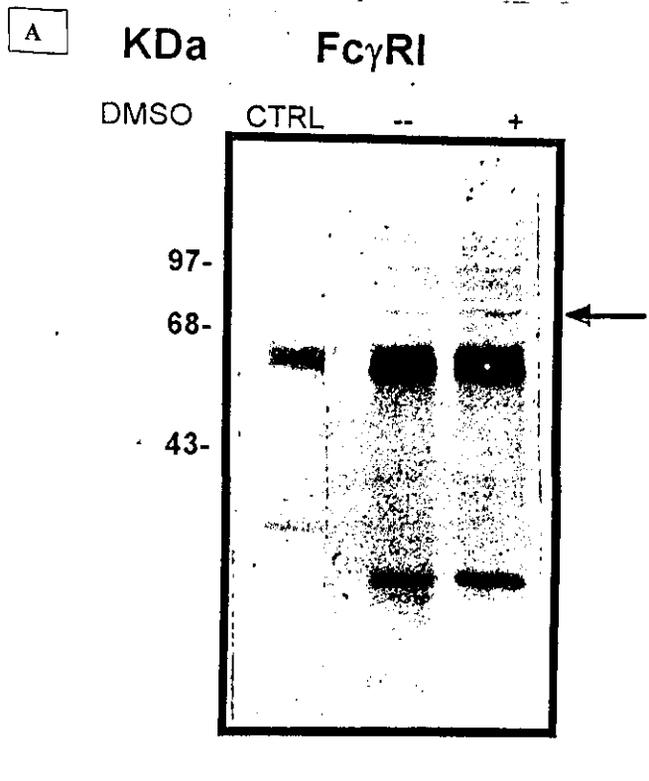


Figura 11. Células THP-1 indiferenciadas e inducidas a la diferenciación con 1.2% de DMSO, se estimularon con los anticuerpos 32.2 (anti-Fc γ RI) y IV.3 (anti-Fc γ RII) y se indujo agregación con un anticuerpo conejo anti-ratón. Las células se lisaron, se inmunoprecipitaron ambos receptores, las proteínas se separaron en un gel SDS-PAGE 12.5% y se realizó un Western Blot con anticuerpos anti-receptor. Inmunoprecipitación de los receptores Fc γ RI (A) y Fc γ RII (B) en células no diferenciadas e inducidas a la diferenciación. Los anticuerpos primarios se detectaron con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina. Se indican los marcadores de peso molecular en kDa.

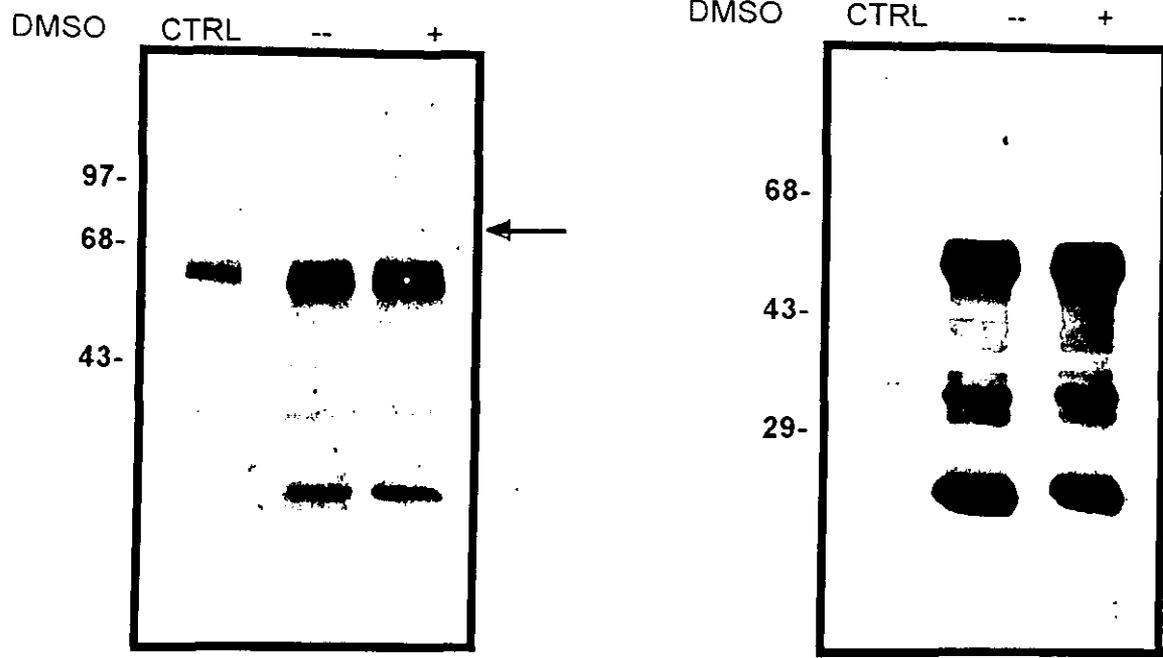
A**KDa****Fc γ RI****B****Fc γ RII**

Figura 11. Células THP-1 indiferenciadas e inducidas a la diferenciación con 1.2% de DMSO, se estimularon con los anticuerpos 32.2 (anti-Fc γ RI) y IV.3 (anti-Fc γ RII) y se indujo agregación con un anticuerpo conejo anti-ratón. Las células se lisaron, se inmunoprecipitaron ambos receptores, las proteínas se separaron en un gel SDS-PAGE 12.5% y se realizó un Western Blot con anticuerpos anti-receptor. Inmunoprecipitación de los receptores Fc γ RI (A) y Fc γ RII (B) en células no diferenciadas e inducidas a la diferenciación. Los anticuerpos primarios se detectaron con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina. Se indican los marcadores de peso molecular en kDa.

BLOT ANTI-PY

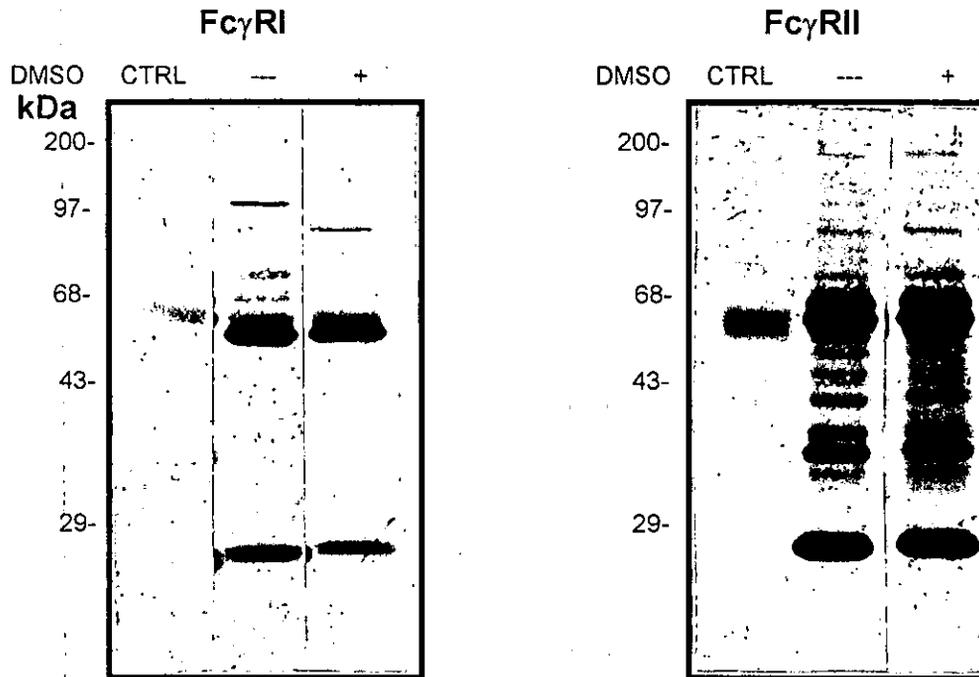


Figura 12. Células THP-1, indiferenciadas e inducidas a la diferenciación con 1.2% de DMSO, se estimularon con los anticuerpos 32.2 (anti-Fc γ RI) y IV.3 (anti-Fc γ RII), y se indujo a la agregación con un segundo anticuerpo, el lisado proteico se incubó con esferas de proteína A-Sefarosa. El inmunoprecipitado se analizó en un gel SDS-PAGE 12.5% y se realizó un Western Blot con anticuerpos antifosfotirosina. Los anticuerpos primarios se detectaron con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina. Se indican los marcadores de peso molecular en kDa.

BLOT ANTI-PY

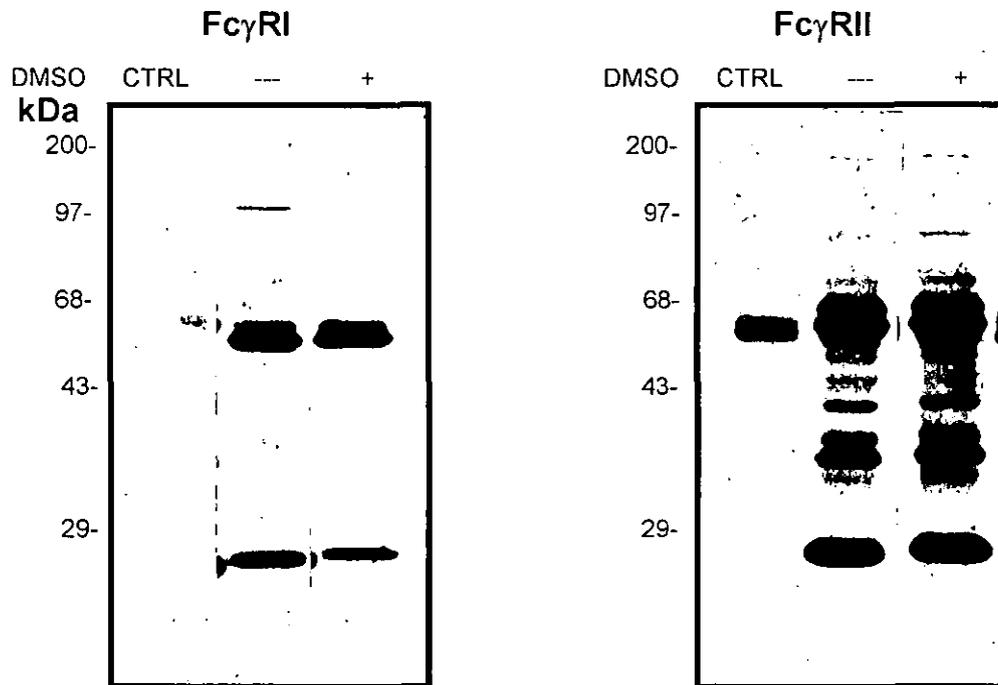


Figura 12. Células THP-1, indiferenciadas e inducidas a la diferenciación con 1.2% de DMSO, se estimularon con los anticuerpos 32.2 (anti-FcγRI) y IV.3 (anti-FcγRII), y se indujo a la agregación con un segundo anticuerpo, el lisado proteico se incubó con esferas de proteína A-Sefarosa. El inmunoprecipitado se analizó en un gel SDS-PAGE 12.5% y se realizó un Western Blot con anticuerpos antifosfotirosina. Los anticuerpos primarios se detectaron con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina. Se indican los marcadores de peso molecular en kDa.

DISCUSION

El proceso de diferenciación en células de leucemia mieloide bajo condiciones normales está determinado por estímulos externos, tales como agentes endógenos (diferenciadores) que pueden provocar respuestas tales como: aumento en la expresión de receptores Fc hasta en un 20% (Harris et al., 1985), adhesión al sustrato por la síntesis y ensamblaje de proteínas del filamento como vimectina, laminina A y laminina C, hasta en un 95%, síntesis y liberación de productos biológicamente activos. Aumento en la actividad de enzimas como la lisozima, la fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y B-D-Glucuronidasa de 2 a 20 veces después de la diferenciación (Koeffler, et. Al., 1983; Harris et al., 1985), entre otros.

El uso de agentes diferenciadores endógenos tales como: ácido retinoico (RA), interferón gamma (IFN- γ), VD3, dimetilsulfóxido (DMSO), forbolestermiristato (TPA), entre otros, en líneas celulares mieloides, induce cambios tanto en el fenotipo como a nivel metabólico, cambios como los que ya arriba se mencionaron, sus efectos se han probado en líneas como HL-60 donde el tratamiento con 1% DMSO causa entre otros aumento en la adherencia (Collins, et al., 1978), y el tratamiento con 10nM de TPA causa aumento en la actividad enzimática de 10 a 20 veces (Rovera, et al., 1979). En la línea celular THP-1 no existen trabajos que reporten diferenciación con DMSO, se ha comprobado el efecto diferenciador del TPA, y la 1,25-Dihidroxivitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃), sobre el aumento en la expresión de los receptores Fc, incrementó de lisozima, aumento en la fagocitosis, producción de CO₂ por la oxidación de la glucosa y adhesión de las células al sustrato, (Suematsu et al., 1997; Bhalla et al., 1989), una vez que ha sido tratada con los agentes.

En este trabajo se tomaron como indicadores de la diferenciación de la línea THP-1, la disminución de la proliferación, adhesión de las células al sustrato, los cambios morfológicos y la actividad de 3 de las enzimas hidrolasas lisosomales: fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y β -D-glucuronidasa, las cuales son sintetizadas por el macrófago. Estas enzimas están involucradas en la degradación intracelular de las partículas fagocitadas.

Para establecer las condiciones de diferenciación in vitro para la línea celular THP-1, se probaron agentes diferenciadores sintéticos como el DMSO y naturales tales como citocinas (IL-1, IL-6, M-CSF) y LPS, ya que se sabe que con este último los macrófagos activados pueden volverse hiperactivos en respuesta a la pared celular de las bacterias (Roit, et al., 1989). Ni las citocinas ni el LPS funcionaron adecuadamente sobre la línea celular, pues no detuvieron la proliferación, ni se observaron cambios morfológicos o adhesión al sustrato, lo cual es uno de los principales indicadores de que las células se están diferenciando; por lo que no se continuaron realizando estudios con ellas. De acuerdo con los resultados obtenidos en la línea celular THP-1 no hay un efecto diferenciador al incubar con M-CSF ó LPS. Por otra parte, aunque la IL-1 e IL-6 no se probaron a distintas concentraciones, se emplearon las concentraciones citadas en la literatura, sin que pudiera observarse algún efecto en la línea THP-1. Esto puede deberse a que se trata de una línea celular en un estado de diferenciación mas avanzado que otras líneas como HL-60 ó k562 y no está respondiendo a estos agentes naturales pues éstos actúan en etapas mas tempranas.

Con el tratamiento diferenciador 1.2% DMSO observamos al tercer día una disminución en la proliferación de las células que crecen en suspensión con respecto a las células control, lo cual puede indicar que se inicia el proceso de diferenciación, a su vez, el

número de células adheridas se incrementó al día 3, lo cual es uno de los principales eventos que acompañan a las células que están en proceso de diferenciación. Una de las causas es la disminución del receptor para insulina, ya que la insulina es un importante regulador del crecimiento, dando como resultado la disminución de la proliferación que acompaña a la diferenciación.

Sin embargo la intensidad con la que actúan los distintos agentes diferenciadores varía de acuerdo a la línea celular y al agente diferenciador (Koeffler, 1983), el DMSO que diferencia fuertemente a la línea HL-60, observamos que diferencia débilmente a la línea THP-1. Comparamos el efecto del DMSO con el de la bufalina y el TPA sobre esta línea (solo se observaron los cambios al microscopio), la bufalina y el TPA parecen tener un mayor efecto diferenciador sobre las células comparado con el efecto del DMSO el cual induce a la diferenciación en un mayor tiempo, ya que los cambios morfológicos como adherencia al sustrato y surgimiento de proyecciones que se observan en 2 a 3 días al tratar con TPA ó bufalina; con 1.2% DMSO los observamos después del 5° día. Por otra parte los cambios en el nivel enzimático no se hacen evidentes hasta después del tercer día, además de que sólo hay una diferencia apenas significativa para la fosfatasa ácida ya que las enzimas B-D-Glucuronidasa y fosfatasa alcalina no mostraron diferencias significativas con el tratamiento diferenciador. Se ha observado que el mayor efecto diferenciador en células de linaje mielóide lo produce el TPA, al causar una mayor disminución de la proliferación, incremento en el número de receptores, aumento en la fagocitosis y en la reducción de NBT (Suematsu et al., 1995; Takeda et al., 1982)

El ensayo de inmunofluorescencia indirecta revela que con el tratamiento 1.2% DMSO no se incrementó el número de receptores, esto concuerda con lo que se ha encontrado en células THP-1 en presencia de DMSO donde la expresión de moléculas HLA tipo I y II, que se incrementa en el proceso de diferenciación, no presenta cambios significativos.

La mieloperoxidasa es una enzima específica del linaje mielomonocítico, se expresa constitutivamente en monocitos y en células como HL-60, sin embargo la actividad de esta enzima se pierde al inducir a estas células con TPA ó RA a la diferenciación, pero no se afecta al emplear DMSO (Rovera, et al., 1977). Se ha reportado que el DMSO diferencia a la línea HL-60 (Collins et al., 1979) de linaje menos maduro que la línea THP-1, ello pudiera ser una de las causas por la cual el DMSO no tiene un efecto tan evidente en las células THP-1. Ya que aunque ambas tienen un origen leucémico, por su morfología se sabe que es una línea con un estado de madurez mas avanzado que las líneas K562 ó KG-1 también leucémicas. Presenta incluso en su superficie los tres tipos de receptores para inmunoglobulina g (Ig), actividad naphthyl butirato esterasa, lisozima y de fagocitosis, es además positiva para HLA clase I y II.

En la célula existen enzimas hidrolíticas, para la digestión intracelular controlada de macromoléculas; tal es el caso de las hidrolasas lisosomales (Catepsina B, b-D-glucuronidasa, hialuronidasa y fosfatasa ácida), proteinasas neutrales (colagenasa, elastasa y activador de plasminógeno), lisozima y arginasa, dichas enzimas se encuentran dentro de vesículas membranosas llamadas lisosomas. Cuando las células monocíticas sufren un proceso de diferenciación, la actividad enzimática se incrementa.

La presencia o ausencia de ciertas enzimas nos indican el estado de maduración de la célula, por ello se les conoce como marcadores. Por ejemplo, las enzimas α -naftilacetatoesterasa (NAE) que es una enzima detectada sólo en megacariocitos y monocitos, y la fosfatasa ácida la cual aparece 3 días después del tratamiento diferenciador, son marcadores de células diferenciadas, pues se incrementan con la diferenciación de la célula, esto se ha comprobado al diferenciar células HL-60 con TPA.

Otros marcadores son la mieloperoxidasa y la acetatocloroesterasa (CAE), éstos contrariamente a la fosfatasa ácida y a la (NAE), disminuyen al inducir a la diferenciación (Rovera, et Al., 1980).

En este estudio se observa que de acuerdo a los parámetros medidos como marcadores de diferenciación, para la línea celular THP-1, el agente diferenciador DMSO induce a la diferenciación de esta línea lo cual se demuestra por el incremento en la enzima fosfatasa ácida la cual es sintetizada en mayor cantidad en el estadio de macrófago; como respuesta a los requerimientos de este estado celular en el cual la célula fagocita gran cantidad de partículas las cuales debe degradar en su interior con la ayuda no de una, sino de varias enzimas (Oppenheim, et al., 1981).

La actividad de fosfatasa ácida fue la mas alta de las tres enzimas que se determinaron, para células tratadas y no tratadas; lo cual indica que aún sin estimular la actividad de esta enzima es alta, debido a que esta enzima está involucrada en la degradación intracelular, la cual es una función importante en el macrófago (Oppenheim, et Al., 1981). Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Koeffler en 1981, donde induce a las líneas KG-1, HL-60 y K562 a diferenciarse con TPA y observa que la enzima β -D-Glucuronidasa se encuentra en menor proporción que la enzima fosfatasa ácida, aunque en ambos casos la cantidad de enzima se incrementa al inducir a la diferenciación (Koeffler, et Al., 1981; Tsuchiya et al., 1982). Esto podría indicar que la enzima fosfatasa ácida es más necesaria en el macrófago, que la β -D-Glucuronidasa, o bien que se requiere una mayor cantidad para llevar a cabo funciones de hidrólisis y degradación.

La actividad que se observó para la enzima fosfatasa alcalina fue baja en comparación con la de fosfatasa ácida, tanto en células control como en células inducidas a la diferenciación y no hay diferencias significativas en los tratamientos. La enzima liberada es apenas ligeramente mayor en células tratadas con respecto a las células control. Esta baja actividad se debe probablemente a que el pH dentro de los lisosomas y al cual están activas las enzimas es de alrededor de 5; y para que las enzimas básicas se activen requieren ser liberadas a un pH básico en el citoplasma.

La actividad de la enzima β -D-glucuronidasa fue mayor en las células tratadas con DMSO, aunque la actividad de esta enzima mostró ser muy baja. Las diferencias no fueron significativas entre células tratadas y no tratadas. Sin embargo la actividad fue siempre ligeramente mayor en las células tratadas con el agente diferenciador al igual que para las otras dos enzimas analizadas.

El aumento en la actividad enzimática y la disminución de la proliferación, así como el aumento en la adherencia celular indica que bajo las condiciones usadas, las células fueron inducidas a diferenciarse, por lo que fueron utilizadas para analizar los patrones de fosforilación inducidos por la agregación de receptores Fc; y realizar una comparación de estos patrones en células diferenciadas y no diferenciadas para tratar de establecer si ambos receptores interactúan con las mismas proteínas ó si se trata de vías diferentes cuando las células están diferenciadas.

Se sabe que la región ITAM de los receptores es esencial para el proceso de transducción de señales al activar a las cinasas iniciadoras de la cascada de activación, evento que incluye el aumento en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) y aumento en la fosforilación de tirosinas y varios de sus sustratos para inducir eventos tales como la activación de factores de transcripción como NF-AT (Factor nuclear de transcripción) y la expresión del marcador de superficie CD69 (Irving y Weiss, 1991).

Análisis mutacionales de receptores quiméricos demostraron que la fosforilación de los residuos de tirosina del dominio ITAM es esencial para que ocurra el proceso de señalización (Letourneur y Klausner, 1992), pues una vez que el dominio ITAM ha sido fosforilado a causa del entrecruzamiento de los receptores, es el punto de anclaje para las proteínas tirosina cinasas (PTK), que participan en los procesos de transducción. Se ha establecido recientemente la participación de la familia de cinasas Src en dichas rutas de señalización, donde la formación de los complejos se lleva a cabo a través de dominios de homología tipo 2 (SH2). Sin embargo las rutas de señalización no están aún completamente comprendidas.

Suponemos que el dominio ITAM participa en la ruta de señalización; pues las diferencias en las secuencias de aminoácidos en el dominio ITAM para cada tipo de receptor provocan patrones de fosforilación distintos para cada uno de los receptores Fc γ , esto fue observado en células estimuladas con el anticuerpo IV.3 y 32.2 en células sin diferenciar y células inducidas a la diferenciación.

Para el caso de células THP-1 se han analizado los patrones de fosforilación al agregar a los receptores Fc γ RI y Fc γ RII (Scholl, et al., 1992; Rankin, et al., 1993; Ghazizadeh, et al., 1994), se ha observado que la fosforilación para Fc γ RII ocurre antes de los 5 min. y para Fc γ RI 5 a 10 minutos después de la agregación. La estimulación y entrecruzamiento de los receptores, provoca una rápida fosforilación en gran número de proteínas. En los ensayos realizados en este trabajo observamos que existen diferencias en el patrón de fosforilación en células estimuladas con los anticuerpos 32.2 (anti-Fc γ RI) y IV.3 (anti-Fc γ RII), con respecto al control; tanto para células indiferenciadas como inducidas a la diferenciación. Es decir la fosforilación de tirosinas se incrementó al entrecruzar a los receptores Fc.

Se ha reportado para ambos receptores Fc γ un aumento en la fosforilación de diversas proteínas (Ghazizadeh, et al., 1994^a; Rankin, et al., 1993). Algunos autores han encontrado que la proteína de 72 kDa que se activa para el receptor Fc γ RII es Syk (Ghazizadeh, et al., 1995). Otros autores coinciden en la activación de Syk para ambos receptores (Argawal, et al., 1993), este estudio se hizo en células HL-60.

En los resultados que aquí se presentan se encontró que al realizar la inmunoprecipitación del receptor Fc γ RI en células THP-1 tratadas con DMSO y en células sin tratamiento las cinasas que inmunoprecipitan son las mismas, el peso de estas tirosinas cinasas es de aproximadamente 57, 64, 80 y 94 kDa. Sin embargo las cinasas de 57, 64 y 96 kDa disminuyen su fosforilación en las células con tratamiento a tal grado que casi no se observan, en cambio la cinasa de 80 kDa incrementa su fosforilación en células con DMSO. Esto nos habla de un posible cambio en la activación de las tirosinas cinasas en células que están siendo inducidas a la diferenciación con respecto a células no inducidas.

En el caso de este receptor (Fc γ RI), las cinasas de 57 y 64 kDa pudieran corresponder a las cinasas Lyn, que tiene un rango de peso molecular de 55 a 58 kDa y Hck que va de los 59 a 64 kDa, respectivamente. Esto tendría que comprobarse utilizando anticuerpos específicos anti-Lyn y anti-Hck, ello se deduce a partir de los amplios reportes que se han publicado con respecto a la participación de las proteínas tirosinas cinasas en el proceso de transducción de señales, muy en particular se sabe de la participación de miembros de la familia Src en el proceso de transducción para receptores Fc γ R, así como de otras muchas tirosinas más de diversos pesos que no están plenamente identificadas.

Sin embargo Ghazizadeh et al., (1994) reporta que Lyn y Hck no se asocian al receptor Fc γ RI, esto tendría que ser comprobado con anticuerpos anti-Lyn y anti-Hck.

Se ha reportado que el patrón de proteínas que resulta al estimular al receptor Fc γ RI y Fc γ RII en la línea celular THP-1 es similar ya que algunas de las cinasas que participan se han encontrado para ambos receptores como es el caso de Syk (p72) (Argawal, et al., 1993; Scholl, et al., 1992), una fosfoproteína de 68 kDa identificada como paxilina (uno de los sustratos de las tirosinas cinasas asociado a citoesqueleto), una proteína de 95 kDa producto del protooncogen Vav, y una proteína de 115 a 165 kDa conocida como FAK ó cinasa de adhesión focal (Pan, et al., 1999). Kiener et al., (1993) demostró que la estimulación en monocitos a través del receptor Fc γ RI y Fc γ RII induce la fosforilación de la Fosfolipasa C (PLC) γ 1, PLC γ 2, Vav y Gap; así como algunas otras cinasas de 40 y 75-85 kDa. Liao et al., (1992) sugiere que al estimular a ambos receptores hay hidrólisis del fosfatidilinositol.

Sin embargo en las inmunoprecipitaciones del receptor Fc γ RII realizadas en este trabajo se obtuvo que precipitaron tirosinas de 40, 48, 64, 72, 97 y 168 kDa, de estas cinasas sólo la de 64 kDa se encuentra en ambos receptores y como ya se mencionó arriba posiblemente se trate de Hck. De manera específica se ha reportado la participación de Lyn y Hck en el proceso de transducción de receptores Fc γ RII en células THP-1 (Ghazizadeh et al., 1994b).

Por otra parte la proteína de 72 kDa probablemente corresponda a la proteína tirosina cinasa Syk de la cual se ha hablado ampliamente sobre su participación en la activación del receptor Fc γ RII (Ghazizadeh, et al., 1995), así como para Fc γ RI (Taylor, et al., 1997). No sabemos si la proteína de 72 kDa corresponde a la cinasa Syk, pues no se utilizaron anticuerpos específicos anti-Syk para determinarlo. En cambio para Fc γ RI no se detectó la activación de alguna tirosina con ese peso, aún cuando no se descarta la posible participación de esta proteína pues se ha reportado su activación cuando ambos receptores son entrecruzados.

En el caso de la proteína de 168 kDa detectada para Fc γ RII pudiera estar relacionada con la cinasa FAK ó cinasa de adhesión focal (Pan, et al., 1999) que tiene un rango de peso de entre 115 a 165 kDa. Aunque esto no se ha comprobado.

Se ha reportado que la presencia del receptor Fc γ RII es esencial para la endocitosis del complejo inmune (Ceuppens et al., 1988). Es probable que el incremento en la fosforilación de las cinasas que se activan al estimular al Fc γ RII en células inducidas a la diferenciación responda a este hecho.

Así como se detectaron cambios en el patrón de fosforilación para el receptor Fc γ RI en células tratadas con DMSO con respecto a las células no tratadas, también para el caso del receptor Fc γ RII se detectaron cambios y contariamente a lo que sucedió con el receptor tipo I, la fosforilación no disminuye sino que se incrementa ligeramente en las proteínas de 64, 72 y 168 kDa.

Se ha reportado que el estallido respiratorio se asocia con la fosforilación de tirosinas y activación de Syk; ya que la generación de reactivos intermediarios de oxígeno (ROI), como aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo funcionan como segundos mensajeros en las rutas de transducción de señales de citocinas, factores de crecimiento así como de la ruta de las proteínas tirosina cinasas (PTKs). Por otra parte, durante el proceso de diferenciación uno de los eventos que se dan es la producción de reactivos intermediarios de oxígeno, esto activa la ruta de PTKs y es posible que por esto se incremente la fosforilación de la proteína de 72 kDa que suponemos puede ser Syk. Algo similar podría estar ocurriendo con las cinasas de 64 y 168 kDa, ya que los pesos de estas cinasas corresponden con los pesos de Hck y FAK. Esto parece indicar que el

receptor FcγRII, es importante en el proceso de diferenciación y que se están activando vías de señalización distintas para ambos receptores. Por otra parte la participación de Syk es esencial, su asociación con el dominio ITAM se da después de la activación-fosforilación de las cinasas de la familia Src, a través de dominios SH2.

Es importante identificar a estas proteínas que se activan por la estimulación de ambos tipos de receptores y analizar si existen otras proteínas que se activen a través de éstos, para poder establecer que proteínas y cuantas de ellas están formando los complejos de transducción de señales que se asocian a cada receptor.

Estas diferencias en los patrones de fosforilación sugieren que al inducir cambios morfológicos y fisiológicos en la célula, algunas de las principales funciones sufren cambios que finalmente actúan en la fosforilación o defosforilación de proteínas importantes que intervienen en el ciclo celular de acuerdo al estado en el que se localiza la célula; como lo es el aumento en la fosforilación de proteínas requeridas para la adhesión. Se sabe que el antígeno CD14 transmite al ser estimulado una señal de activación, pues tiene actividad de proteína cinasa, esto sugiere que la señalización ocurre por fosforilación de proteínas. De hecho algunas proteínas muestran un aumento en la fosforilación después de activar a monocitos con LPS. (Ziegler, et.al., 1993).

Por otra parte la proteína tirosina cinasa C (PKC) juega un papel crucial en el crecimiento celular y la diferenciación. La activación de esta enzima es un evento temprano en la cascada de transducción (2 a 5 minutos), el Diacilglicerol (DAG), el cual activa a la PKC, está siendo continuamente activado en el proceso de diferenciación, ello sugiere que este proceso requiere una activación prolongada de PKC (Nishizuka, 1986). Se sabe que la exposición de células HL-60 y U937 al TPA activa a la proteína cinasa C (PKC) por translocación de la enzima del citosol a la membrana celular (Krafft y Anderson, 1983), así como incremento en el patrón de lípidos celulares, los niveles de colesterol y fosfatidilcolina se incrementan mientras que los niveles de fosfatidiletanolamina se reducen.

Fosfolípidos tales como fosfatidilserina y fosfatidilinositol permanecen inalterados (Kohler, et al., 1990), todos estos cambios en el nivel de lípidos es muy posible que repercutan en el proceso de transducción y más específicamente en las cinasas que se activan y que tan fuerte es la fosforilación ello explica las diferencias en el patrón de fosforilación analizado a los días 1,3 y 5. En dicho experimento observamos cambios drásticos del día 1 al día 5, esto nos indica que en el caso de células inducidas a la diferenciación, la fosforilación de tirosinas se ve incrementada durante el proceso, y se vuelve mas específica, pues se activan sólo ciertas cinasas, como es el caso de una tirosina de aproximadamente 50 kDa la cual se mantiene presente desde el primer día y aumenta su fosforilación al quinto día de tratamiento. Todos estos cambios en los patrones de fosforilación ocurridos con el transcurso de los días nos indica que están ocurriendo cambios no solo morfológicos sino también cambios a nivel de activación y desactivación de proteínas que probablemente participen en el proceso de diferenciación. El estudio de Meléndez et al., (1999), muestra que la agregación del receptor FcγRI en células U937 tratadas con IFN-γ, incrementa la actividad de algunas isoformas de PKC (proteína tirosina cinasa C) dependientes de calcio a diferencia de células control, lo cual involucra rutas de señalización diferentes en células que están en estado de reposo con respecto a células en estado de diferenciación.

En este y otros estudios se ha comprobado la fosforilación del receptor al interactuar con su ligando. Para el caso de los receptores FcγRI y FcγRII en células THP-1

esto se encuentra bien documentado en células indiferenciadas. Estudios en plaquetas demuestran que la activación de Fc γ RII induce la fosforilación de múltiples proteínas tirosinas cinasas e incluso del receptor (Huang et al., 1992). Con el presente trabajo pudimos percatarnos de que aún en células inducidas a la diferenciación el receptor es fosforilado, e incluso la fosforilación del mismo se incrementa con respecto a células no estimuladas aunque muy levemente.

El dominio ITAM cuenta con un dominio consenso cuya secuencia es: D/E-X(2)-Y-X(2)-L/I-X(7)-Y-X(2)-L/I, esta misma secuencia la encontramos en otros tipos de receptores como CD3 γ , CD3 ϵ , CD3 δ , TCR ζ_1 , TCR ζ_2 , TCR ζ_3 , Ig α , Ig β , Fc ϵ RI- β , Fc ϵ RI- γ , tanto en humano como en ratón. La presencia de estos residuos conservados de tirosina, leucina/isoleucina (L/I) y los espacios entre ellos, son críticos para las funciones biológicas del ITAM (Isakov, 1998), pues esta estructura permite ensamblar al receptor múltiples moléculas de señalización y fosforilarlas en sus residuos de tirosina. Se ha demostrado ampliamente la participación de las PTKs de la familia Src en el proceso de transducción de señales. Esta familia que consta de ocho miembros, presenta mecanismos de regulación y función similares, así como regiones de homología en su estructura. Sin embargo las cinasas que se activan al estimular al receptor de la célula T (Lck y Fyn), no son exactamente las mismas que se activan al estimular al receptor de la célula B (blk, lyn y fyn) ó al estimular al Fc γ R (hck, lyn). Pues si bien los diferentes receptores presentan regiones iguales, también presentan secuencias que varían de un receptor a otro incluso para cada una de las isoformas de Fc γ R. Ello sugiere que las rutas de señalización pueden ser diferentes para cada isoforma debido a la variación en las secuencias que comprenden al dominio ITAM; tal como se encontró en los resultados de este trabajo.

Respecto al mecanismo por el cual ocurren los cambios morfológicos y fisiológicos, se sabe que el agente diferenciador Mizonibina actúa inhibiendo la formación de Inosina-5-Monofosfato (IMP) el cual cataliza la reacción de síntesis de nucleótidos de guanina implicados en el crecimiento celular y la diferenciación (Kunihiro, et al., 1997). No se conoce el mecanismo de diferenciación del DMSO y no puede asegurarse que actúe de igual forma que la mizonibina, se sabe que la bufalina que es también un agente diferenciador actúa inhibiendo a las Na⁺ y K⁺ ATPasas (Numazawa, et al., 1996). Sin embargo al observar una disminución en la fosforilación de algunas proteínas, podríamos suponer que dejan de ser activadas en la señalización, algunas proteínas que intervienen en la proliferación, pues una de las principales características de las células en proceso de diferenciación, es que cesan de proliferar. La Bufalina, otro inductor de la diferenciación en la línea celular THP-1, se ha visto que tiene efecto en la expresión de protooncogenes, ocasionando una pérdida en la expresión de c-myc, y c-myb y sobreexpresión de Erg-1 y c-fos. Estos efectos corresponden a una activación de proteínas tirosinas cinasas (PTKs), debido al proceso de diferenciación (Numazawa et al., 1996).

Basados en las diferencias en el patrón de fosforilación encontrados para receptores Fc γ RI Y Fc γ RII, podemos concluir que es necesario realizar una serie de experimentos utilizando péptidos sintéticos que representan las regiones ITAM de ambos receptores para determinar si precipitan las mismas proteínas que se están fosforilando al estimular con el anticuerpo anti-receptor y de esta manera demostrar la participación de las regiones ITAM en la formación de complejos de transducción de señales diferentes para cada receptor.

CONCLUSIONES

El tratamiento con 1.2% DMSO durante 3 días induce disminución de la proliferación, adhesión al sustrato, cambios morfológicos en aproximadamente 10% de la población en cultivo, la diferencia fue estadísticamente significativa. No hay aumento en la expresión de receptores.

La actividad de las enzimas fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y B-D-Glucuronidasa es superior en células con tratamiento diferenciador con respecto a las células control. No hay diferencia estadística significativa en los tratamientos.

El DMSO empleado a la concentración 1.2% es un débil diferenciador de la línea celular THP-1.

El proceso de diferenciación produce cambios en la activación de proteínas a través del paso de los días, son menos las cinasas que se activan al día 5 y la activación de estas se incrementa con respecto al día 1 del tratamiento. Permanece activa una cinasa de 50 kDa, la cual se activa fuertemente al quinto día en células con tratamiento.

Al entrecruzar e inmunoprecipitar al Fc γ RI se detectó la fosforilación en tirosina de 4 cinasas de aproximadamente 57, 64, 80 y 94 kDa. Las cuales están presentes en células inducidas a la diferenciación y células sin tratamiento. En células inducidas a la diferenciación se incrementa la fosforilación de la proteína de 80 kDa. Las cinasas de 57 y 64 kDa podrían corresponder a las cinasas Lyn y Hck respectivamente pues así se ha reportado para esta línea celular sin embargo esto debe ser comprobado para poder asegurarlo.

Al entrecruzar e inmunoprecipitar al Fc γ RII se detectó la fosforilación en tirosina de 6 tirosinas cinasas de aproximadamente 40, 48, 64, 72, 97 y 168 kDa. En células con tratamiento diferenciador se detectó un ligero aumento en la fosforilación de las tirosinas de aproximadamente 64, 72 y 168 kDa

Los patrones de fosforilación entre los receptores Fc γ RI y Fc γ RII son diferentes pues se activan proteínas tirosina cinasas de diferente peso molecular, excepto por una tirosina de 64 kDa que se localiza en ambos receptores.

BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A.K., Andrew, H.L. y Jordan S.P., (1995), *Inmunología celular y molecular*. 2a. edición. Ed. Interamericana. España. 517 pp.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D., (1983), *Biología molecular de la célula*. Segunda edición. Ed. Omega. Barcelona. 1232 pp.
- Allen, J.M., y Seed, B., (1989). Isolation and expression of functional high-affinity Fc receptor complementary DNAs. *Science*. 243: 378-381.
- Anderson, C.L., (1982). Isolation of the receptor for IgG from a human monocyte cell line (U937) and from human peripheral blood monocytes. *J. Exp. Med.* 156: 1794-1805.
- Anderson, C.L., (1989). Human IgG Fc receptors. *Clin. Immunol. and Immunopathology*. 53: S63-S71.
- Anderson, C.L., y Abraham, G.N., (1980). Characterización of the Fc receptor for IgG on a human macrophage cell line, U937. *J. Immunol.* 125: 2735-2741.
- Anderson, C.L., Guyre, P.M., Whithin, J.C., Ryan, D.H., Looney, R.J. y 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 line. *J. Biol. Chem.* 261: 12856-12864
- Anderson, C.L., Shen, L., Eicher, D.M., Wewers, M.D. y Gill, J.K., (1990). Phagocytosis mediated by three distinct Fcγ receptor classes on human leukocytes. *J. Exp. Med.* 171: 1333-1345.
- Agarwal, A., Salem, P. y Robbins K.C., (1993). Involvement of p72^{syk}, a protein-tyrosine kinase, in Fcγ receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 268 (21): 15900-15905.
- Auger, K.R., Serunian, L.A., Soltoff, S.P., Libby, P y Cantley, L.C., (1989). PDGF-Dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. *Cell*, 57: 167-175.
- Azzoni, L., Kamoun, M., Salcedo, T.W., Kanakaraj, P. y Perussia, B. (1992). Stimulation of FcγRIIA results in phospholipase C-γ1 tyrosine phosphorylation and p56^{lck} activation. *J. Exp. Med.* 176: 1745-1750.
- Benhamou, M., Ryba, N.J.P., Kihara, H., Nishikata, H., y Siraganian, R.P., (1993). Protein-tyrosine kinase p72^{syk} in high affinity IgE receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 268: 23318.
- Benjamini, E., Sunshine, G. y Leskowitz, S., (1996), *Immunology*. 3a. Edición, Ed. Wiley-Liss. U.S.A. 484 pp.
- Bhalla, A.K., Williams, M.M., Lal, S. y Lydyard, P.M., (1989), 1,25-Dihidroxyvitamin D₃ but not retinoic acid, induces the differentiation of U937 cells, *Clin. Exp. Immunol.*, 76:274-277.
- Bolen, J.B., (1991). Signal transduction by the SRC family of tyrosine protein kinases in hematopoietic cells. *Cell Growth and differentiation*. 2: 409-414.

Braakman, E., van de Winkel, J.G.J., van Krimpen, B.A., Jansze, M. y Bolhuis, R.L.H., (1992). CD16 on human γ δ T lymphocytes: Expression, function and specificity for mouse IgG Isotypes. *Cell. Immunol.* 143: 97-102.

Brooks, D.G., Qui, W.Q., Luster, A.D. y Ravetch, J.V., (1989). Structure and expression of human IgG Fc γ RII (CD32). *J. Exp. Med.* 170: 1369-1385.

Burkhardt, A.L., Stealey, B., Rowley, R.B., Mahajan, S., Prendergast, M., Fargnoli, J. y Bolen, J.B., (1994). Temporal regulation of non-transmembrane protein tyrosine kinase enzyme activity following T cell antigen receptor engagement. *J. Biol. Chem.* 269: 23642-23647.

Burkhardt, A.L., Brunswick, M., Bolen, J.B. y Mond, J.J., (1991). Anti-immunoglobulin stimulation of B lymphocytes activates Src-related protein-tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 7410-7414.

Cambier., J.C., Daerön, M., Fridman, W., Gergely, J. y Kinet J-P. (1994). New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL). *Immunol Today.* 16: 110-115.

Carpenter, C.L., Duckworth, B.C., Auger, K.R., Cohen, B., Schaffhausen, B.S. y Cantley, L.C., (1990). Purification and characterization of phosphoinositide 3-Kinase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 265 (32): 19704-19711.

Ceppens J.L., Baroja M.L., Van Vaeck F., y Anderson C.L., (1988). Defect in the membrane expression of the high affinity 72 kDa Fc receptors on phagocytic cells in four healthy subjects. *J. Clin. Invest.* 82: 571.

Clark, M.R., Campbell, K.S., Kazlauskas, A., Johnson, S.A., Hertz, M., Potter, T.A., Peiman, C. y Cambier, J.C., (1992). The B cell antigen receptor complex: Association of Ig- α and Ig- β with distinct cytoplasmic effectors. *Science*, 258: 123-126.

Cohen, L., Sharp, S. y Kulczycki, A., Jr. Human monocytes, B lymphocytes and non-B lymphocytes each have structurally unique Fc receptors. *J. Immunol.* 131: 378-383.

Collins, S.J. (1987). The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation and cellular oncogene expression. *Blood* 70: 1233-1244.

Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E. y Gallo, R.C., (1979). Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by DMSO. *J. Exp. Med.* 149: 969-976.

Cone, J.C., Lu, Y., Trevillyan, J.M., Björndahl, J.M. y Phillips, C.A., (1993). Association of the p56^{lck} protein tyrosine kinase with the Fc γ RIIA/CD16 complex in human natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 23: 2488-2497.

Cooper, J.A. y MacAuley, A., (1988). Potential positive and negative autoregulation of p60c-src by intermolecular autophosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 4232-4236.

Cooper, J.A., y Howell, B., (1993). The when and how of Src regulation. *Cell*, 73, 1051-1054.

Daerön, M., (1997). Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234.

Daerön M., Latour, S., Malbec, O., Espinosa, E., Piña, P., Pasmans, S. y Fridman, W.H., (1995). The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of FcγRIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity.* 3: 335-346.

Debets, J.M.H., Van de Winkel, J.G.J., Ceuppens, J.L., Dieteren, I.E.M. y Buurman, W.A., (1990). Crosslinking of both FcγRI and FcγRII induces secretion of tumor necrosis factor by human monocytes, requiring high-affinity Fc-FcγR interactions. *J. Immunol.* 144:1304-1310.

Denny, M.F., Kaufman, H.C., Chan, A.C. y Straus, D.B., (1999). The Lck SH3 domain is required for activation of the mitogen-activated protein kinase pathway but not the initiation of T-Cell antigen receptor signaling.

Dougherty, G. J., Selvendran, Y., Murdoch, S., Palmer, D.G. y Hogg, N., (1987). The human mononuclear phagocyte high-affinity Fc receptor, FcRI, defined by a monoclonal antibody, 10.1. *Eur. J. Immunol.* 17: 1453-1459.

Durden, D.L. y Liu, Y.B., (1994). Protein-tyrosine kinase p72syk in Fc gamma RI receptor signaling. *Blood* 84: 2102-2108.

Eiseman, E., y Bolen, J.B., (1990). Src-related tyrosine protein kinases as signaling components in hematopoietic cells. *Cancer cells.* 2: 303-310.

Eiseman, E. y Bolen, J.B., (1992). Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases. *Nature* 355: 78-80.

Ernst, L.K., Duchemeyn, A.M., y Anderson, C.L. (1992). Three genes for the human high affinity Fc receptor for IgG (FcγRI) encode four distinct transcription products. *J. Biol. Chem.* 267: 15692-15700.

Ernst, L.K., Duchemeyn, A.M., y Anderson, C.L. (1993). Association of the high affinity receptor for IgG (FcγRI) with the γ subunit of the IgE receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 6023-6027.

Fanger, M.W., Shen, L., Graziano, R.F. y Guyre, P.M., (1989). Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG. *Immunol. Today.* 10: 92-99.

Farance, F., Mitjabila, M.T., Betaieb, A., Dokhelar, M.C., Wiels, J., Finale, Y., Kieffer, N., Breton-Gorius, J., Vainchenker, W. y Tursz, T., (1988). New hematopoietic differentiation antigens detected by anti K562 monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 48: 4759.

Fleit, H.B., y Kuhnle, M., (1988). Biochemical characterization of an Fcγ receptor purified from human neutrophils. *J. Immunol.* 140: 3120-3125.

Fleit, H.B., W. S.D. y Unkeless, J.C., (1982). Human neutrophil Fc receptor distribution and structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 3275-3279.

Fries, L.F., Hall, R.P., Lawley, T.J., Crabtree, G.R. y Frank, M.M., (1982). Monocyte receptors for the Fc portion of IgG studies with monomeric human IgG1: Normal in vitro expression of Fc receptors in HLA-B8-Drw 3 subjects with defective Fc mediated in vivo clearance. *J. Immunol.* 129: 1041-1049.

Gessani, S., Testa, U., Varano, B., Di Marcio, P., Borghi, P., Conti, L., Barberi, T., Tritaregi, E., Martucci, R., Seripa, D., Peschle, C. y Belardelli, F. (1993). Enhanced production of LPS induced cytokines during differentiation of human monocytes to macrophages. *J. of Immunol.* 151(7):3758-3766.

Ghazizadeh, S. y Fleit, H.B., (1994a). Tyrosine phosphorylation provides an obligatory early signal for FcγRII-mediated endocytosis in the monocytic cell line THP-1. *J. Immunol.* 152 (1): 30-41.

Ghazizadeh, S., Bolen, J.B. y Fleit, H.B., (1994b). Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with FcγRII in monocytic THP-1 cells. *J. Biol. Chemistry.* 269 (12): 8878-8884.

Ghazizadeh, S., Bolen, J.B. y Fleit, H.B., (1995). Tyrosine phosphorylation and association of Syk with FcγRII in monocytic THP-1 Cells. *Biochem. J.* 305: 669-674.

Gold, M.R. y Aebersold, R., (1994). Both phosphatidylinositol 3-kinase and phosphatidylinositol 4-kinase product are increased by antigen receptor signaling in B cells.

Gold, M.R., Law, D.A. y De Franco, A.L., (1990). Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by the B-lymphocyte antigen receptor. *Nature*, 348: 810-813.

Gulle, H., Samstag, A., Eibl, M.M y Wolf, H.M. (1998). Physical and functional association of Fc alpha R with protein tyrosine kinase Lyn. *Blood*, 91(2):383-391.

Guyre, P.M., Morganelli, P.M. y Miller, R. (1983). Recombinant immune interferon increases immunoglobulin G Fc receptors on cultured human mononuclear phagocytes. *J. Clin. Invest.* 72: 393-397.

Harris, P.E., Ralp, P., Gabrilove, J., Welte, K., Karmali, R. y Moore, M., (1985). Distict differentiation-inducing activities of gamma interferon and cytokine factors acting on the human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Cancer Res.* 45: 3090.

Harrison, D., Phillips, J.H. y Lanier, L.L., (1991). Involvement of a metalloprotease in spontaneous and phorbol ester-induced release of natural killer cell-associated FcγRIII (CD16). *J. Immunol.* 147: 3459-3465.

Hunter, S., Burton, E.A., Wu, S.C. y Anderson S.M. (1999). Fyn associates with Cbl and phosphorylates tyrosine 731 in Cbl, a binding site for phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 274(4): 2097-2106.

Huang, M.M., Indik, Z., Brass, L.F., Hoxie, J.A., Schreiber, A.D. y Brugge, J.S., (1992). Activation of FcγRII induces tyrosine phosphorylation of multiple proteins including FcγRII. *J. Biol. Chem.* 267: 5467-5473.

Huizinga, T.W.J., Van Kemedane, F., Koenderman, L., Dolman, K.M., Von den Borne, A.E.G., Tetterroo, P.A.T. y Roos, D., (1989). The 40 kDa Fc γ receptor (Fc γ RII) on human neutrophils is essential for the IgG-induced respiratory burst and IgG-induced respiratory burst and IgG-induced phagocytosis. *J. Immunol.* 142: 2365-2269.

Huizinga, T. W.J., de Haas, M., Kleijer, M., Nuijens, J.H., Roos, D. y Von dem Borne, A.E.G.Kr. (1990). Soluble Fc γ receptor III in human plasma originates from release by neutrophils. *J. Clin. Invest.* 86 (2): 416-423.

Hutchcroft, J.E., Harrison M.L. y Geahlen, R.L., (1991). B lymphocyte activation is accompanied by phosphorylation of a 72 kDa protein tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 266 (23): 14846-14849.

Hutchcroft, J.E., Geahlen, R.L., Deanin, G.G. y Oliver, J.M., (1992a). Fc epsilon R1-mediated tyrosine phosphorylation and activation of the 72-kDa protein-tyrosine kinase, PTK72, in RBL-2H3 rat tumor mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 9107-9111.

Hutchcroft, J.E., Harrison, M.L. y Geahlen, R.L., (1992b). Association of the 72-kDa protein-tyrosine kinase PTK72 with the B cell antigen receptor. *J. Biol. Chem.* 267 (12): 8613-8619.

Indik, Z., Kelly, C., Chien, P., Levinson, A.I. y Schreiber, A.D. (1991). Human Fc γ RII, in the absence of other Fc γ receptors, mediates a phagocytic signal. *J. of Clin. Invest.* 88: 1766-1771.

Irving, B.A., y Weiss, A., (1991). The cytoplasmic domain of the T cell receptor ζ chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell.* 64: 891-901.

Isakov, N., (1998). Role of immunoreceptor tyrosine-based activation motif in signal transduction from antigen and Fc receptors. *Adv. In Immunol.* 69: 183-247.

Iwashima, M., Irving, B.A., Van Oers, N., Chan, A.C. y Weiss, A., (1994). Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* 263: 1136-1139.

Kanda, H., Mimura, T., Hawasaki, K., Yamamoto, K., Yazaki, Y., Hirai, H. y Nojima, Y. (1999). Fyn and Lck tyrosine kinases regulate tyrosine phosphorylation of p105^{cas}, a member of the p130^{cas} docking protein family, in T-cell receptor-mediated signalling. *Immunol.* 97(1): 56-61.

Karas, S.P., Rosse, W.F. y Kurlander R.J., (1982). Characterization of the IgG-Fc receptor on human platelets. *Blood.* 60: 1277-1282.

Karnitz, L.M y Abraham, R. T., (1996). Interleukin-2 receptor signaling mechanisms. *Advances in immunology.* 61:147-199.

Kiener P.A., Rankin, B.M., Burkhardt, A.L., Schieven, G.L., Gilliland, L.K., Rowley, R.B., Bolen, J.B. y Ledbetter, J.A., (1993). Cross-linking of Fc γ receptor I (Fc γ RI) and receptor II (Fc γ RII) on monocytic cells activates a signal transduction pathway common to both Fc receptors that involves the stimulation of p72 Syk protein tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 268 (32): 24442-24448.

- Koeffler, P. B. H. (1983). Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells: therapeutic implications. *Blood*, 62(4):709-721.
- Kohler, L., Hass, R., Wessel, K., Goppelt-Strube, M., Kaever, V. y Resch, K. (1990). Altered arachidonic acid metabolism during differentiation of the human monoblast cell line U937. *Biochem. Biophys. Acta*. 1042: 395-381.
- Krapt, A.S. y Anderson, W.B. (1983). Phorbol esters increase the amount of Ca^{2+} , phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature*, 301: 521.
- Krutman, J., Kirnbauer, R., Kock, A., Schwarz, T., Schopf, E., May, L.T., Sehgal, P.B. y Luger, T.A., (1990). Crosslinking Fc receptors on monocytes triggers IL-6 production. *J. Immunol.* 145:1337-1342.
- Kulczycki, A., Jr., (1984). Human neutrophils and eosinophils have structurally distinct Fc receptors. *J. Immunol.* 133: 849-854.
- Kurlander, R.J. y Batker, J., (1982). The binding of human immunoglobulin G1 monomer and small, covalently cross-linked polymers of immunoglobulin G1 to human peripheral blood monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.* 69: 1-8.
- Kurlander, R.J., Haney, A.F. y Gartrell, L., (1984). Human peritoneal macrophages possess two populations of IgG Fc receptors. *Cell. Immunol.* 86: 479-490.
- Lanier, L.L., Ruitenberg, J.J. y Phillips, J.H., (1988). Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J. Immunol.* 141: 3478-3485.
- Liao, F., Shin, H.S. y Rhee, S.G., (1992). Tyrosine phosphorylation of phospholipase Cg1 induced by cross-linking of the high-affinity or low-affinity Fc receptor for IgG in U937 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 3659-3663.
- Letourner, F. y Klausner, (1992). Activation of the T cells by a tyrosine Kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 ϵ . *Science* 255: 79-82.
- Looney, R.J., Abraham, G.N. y Anderson, C.L., (1986). Human monocytes and U937 cells bear two distinct Fc receptors for IgG. *J. Immunol.* 136:1641-1647.
- Looney, R.J., Ryan, D.H., Takahashi, K., Fleit, H.B., Cohen, H.J., Abraham, G.N. y Anderson, C.L., (1986^a). Identification of a second class of IgG receptors on human neutrophils: A 40 kDa molecule also found on eosinophils. *J. Exp. Med.* 163: 826-836.
- Matsuda, M., Mayer, B.J., Fukui, Y. y Hanafusa, H., (1990). Binding of transforming protein p47^{ras-crk} to a broad range of phosphotyrosine containing proteins. *Science*, 248: 1537-1539.
- Matsuo, T., Hazeki, K., Katada, T. y Michio, U., (1996). Specific association of phosphatidylinositol 3-kinase with the protooncogene product Cbl in Fc γ receptor signaling, *FEBS letters*, 382:11-14.

Melendez, A.J., Harnett, M.M. y Allen, J.M. (1999). Differentiation-dependent switch in protein kinase C isoenzyme activation by Fc γ RI, the human high-affinity receptor for immunoglobulin G. *Immunol.* 96(3): 457-464.

Metcalf, B. D., Begley, C.G., Johnson, G.R., Nicola, N.A., Vadas, M.A., Lopez, A.F., Williamson, D.J., Wong, G.G., Clark, S.C. y Wang, E.A. (1986). Biologic properties in vitro of a recombinant human Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor. *Blood*, 67(1):37-45.

Nebreda, A. R., (1994). Inactivation of MAP kinases. *TIBS.* 19: 474-480.

Ninimiya, N., Hazeki, K., Fukui, Y., Seya, T., Okada, T., Hazeki, O. y Ui, M., (1994). Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc γ receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 269: 22732-22737.

Noriyuki, N., Hazeki, K., Fukui, Y., Seya, T., Okada, T., Hazeki, O. y Michio Ui., (1994). Involvement of Phosphatidylinositol 3-kinase in Fc γ Receptor Signaling, *J. Biol. Chem.*, 269(36):22732-22737.

Numazawa, S., Inoue, N., Nakura, H., Sugiyama, T., Fujino, E., Shinoki, M., Yoshida, T. y Kuroiwa, Y., (1996). A cardiotonic steroid bufalin-induced differentiation of THP-1 cells, *Biochemical pharmacology*, 52:321-329.

Odin, J.A., Edberg, J.C., Painter, C.J., Kimberly, R.P. y Unkeless, J.C. (1991). Regulation of phagocytosis and ([Ca²⁺]_i) flux by distinct regions of an Fc receptor. *Science.* 254: 1785-1788.

Pan, X-Q., Darby, C., Indik, Z.K. y Schreiber, A.D., (1999). Activation of three classes of nonreceptor tyrosine kinases following Fc γ receptor crosslinking in human monocytes. *Clin. Immunol.* 90(1): 55-64.

Park, R-K., Izadi K.D., Deo, Y.M. y Durden, D.L., (1999). Role of Src in modulation of multiple adaptor proteins in Fc α RI oxidant signaling. *Blood*, 94(6): 2112-2120.

Penhallow, R.C., Class, K., Sonoda, H., Bolen J.B. y Rowley, R.B., (1995). Temporal activation of nontransmembrane protein-tyrosine kinases following mast cell Fc ϵ RI engagement. *J. Biol. Chem.* 270: 23362-23365.

Perussia, B., Dayton, E.T., Lazarus, R., Fanning, V. y Trinchieri, G., (1983). Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells. *J. Exp. Med.* 158: 1092-1113.

Pulford, K., Ralfkiaer, E., Macdonald, S.M., Erber, W.N., Falini, B., Gatter, K.C. y Mason, D.Y., (1986). A new monoclonal antibody (KB61) recognizing a novel antigen which is selectively expressed on a subpopulation of human B lymphocytes. *Immunology*, 57: 71.

Qui, W.Q., Bruin, D., Browstein, B.H., Pearse, R. y Ravetch, J.V., (1990). Organization of the human and mouse low-affinity Fc γ R genes evidence for duplication and recombination. *Science* 248: 732-735.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

- Rankin, B.M., Yocum, S.A., Mittler, R.S. y Kiener, P.A., (1993). Stimulation of tyrosine phosphorylation and calcium mobilization by Fc γ receptor cross-linking. *J. Immunol.* 150: 605-616.
- Ravetch, J.V., (1994). Fc receptors: Rubor redux. *Cell*, 78:553-560.
- Ravetch, J.V., y Perussia, B., (1989). Alternative membrane forms of Fc γ RIII on human NK cells and neutrophils: cell type specific expresion of two genes which differ in single nucleotide substitutions. *J. Exp. Med.* 170: 481-497.
- Ravichandran, K.S. y Burakoff, S.J. (1993). The adapter protein Shc interacts with the interleukin-2 (IL-2) receptor upon IL-2 stimulation. *J. Biol. Chem.* 269(3):1599-1602.
- Reth, M.G. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature.* 338: 383-384.
- Rezaul, K., Sada, K. y Yamamura, H. (1998). Involvement of reactive oxygen intermediates in lectin-induced protein-tyrosine phosphorylation of Syk in THP-1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246(3): 863-867.
- Roadaway, A.R., Stenberg, M.J. y Bentley, D.L., (1989). Similarity in membrane proteins. *Nature*, 342: 624.
- Romeo, C.M., Amiot y Seed B. (1992). Sequence requeriments for induction of cytolysis by the T cell antigen / Fc receptor z chain. *Cell*, 68: 889-897.
- Rosenfeld, S.I., Looney, R.J., Leddy, J.P., Phipps, D.C., Abraham, G.N. y Anderson, C.L., (1985). Human platelet Fc receptor for immunoglobulin G: Identification as a 40 000 molecular weight membrane protein shared by monocytes. *J. Clin. Invest.* 76: 2317-2322.
- Rovera, G., O' Brient, T. y Diamond, L., (1977). Induction of differentiation in human promyelocytic leukemia by tumor promoters. *Science.* 204: 868.
- Rovera, G, Santoli, D. y Damsky, C. (1979). Human promyelocytic leukemic cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 2779.
- Rumpold, H., Kraft, D., Obexer, G., Bock, G. y Gehart, W., (1982). A monoclonal antibody against a surface antigen shared by human large granular lymphocytes and granulocytes. *J. Immunol.* 129: 1458-1464.
- Samelson, L.E., Phillips, A.F., Loung, E.T. y Klausner, R.D., (1990). Association of the Fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 4358-4362.
- Santana, C., Noris, G., Espinosa, B. y Ortega, E., (1996). Protein tyrosine phosphorylation in leukocyte activation through receptors for IgG. *J. Leukoc. Biol.* 60: 433-440.
- Saouaf, S.J., Mahajan, S., Rowley, R.B., Kut, S.A., Fargnoli, J, Burkhardt, A.L., Tsukada, S., Witte, O.N. y Bolen, J.B., (1994). Temporal differences in the activation of three classes of non-transmembrane protein tyrosine kinases following B-cell antigen receptor surface engagement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 9524-9528.

Scholl, P.R., Abern, D. y Geha R.S., (1992). Protein tyrosine phosphorylation induced via the IgG receptors FcγRI and FcγRII in the human monocytic cell line THP-1. *J. Immunol.* 149 (5): 1751-1757.

Segal D.M., Taurog, J.D. y Metzger H. (1977). Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 2993-2997.

Simms, H.H., Gaither, T.A., Fries, L.F. y Frank, M.M., (1991). Monokines released during short term Fcγ receptor phagocytosis up-regulate polymorphonuclear leukocytes and mono-phagocytosis function. *J. Immunol.* 147: 265-272.

Stahl, M.L., Ferenz, C.R., Kelleher, K.L., Kriz, R.W. y Knopf, J.L. (1988). Sequence similarity of phospholipase C with the non-catalytic region of src. *Nature*, 332: 269-272.

Stiles, D.P. Terr,A.I., (1993), *Inmunologia básica y clínica. séptima edición*, ed. El manual moderno, México. 1055pp. pags:121-133,56-166.

Stokoe, D., Macdonald, S.G., Cadwallader, K., Symons, M. y Hancock, J.F., (1994). Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science*, 264:1463:1467.

Suematsu, Y., Nishizawa, Y., Shioi, A., Hino, M., Tahara, H., Inaba, M., Morii, H. y Otani, S., (1995), Effect of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ on induction of scavenger receptor and differentiation of 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate-treated THP-1 human monocyte like cells, *J. of cell. physiology*, 165:547-555.

Sun H. y Tonks N.K., (1994). The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochemical Science.* 19: 474-480.

Takeda, K., Minowada, J. y Bloch, A., (1982), Kinetics of appearance of differentiation-associated characteristics in ML-1, a line of human myeloblastic leukemia cells, after treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, dimethyl sulfoxide, or 1-b-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer research*,42:5152-5158.

Taylor, N., Jahn, T., Smith, S., Lamkin, T., Uribe, L., Liu, Y., Durden, D.L. y Weinberg, K., (1997). Differential activation of the tyrosine kinases ZAP-70 and Syk after FcγRI stimulation. *Blood*, 89(2): 388-396.

Tijman, W.B., Capel, P.J.A. y van de Winkel, J.G.J. (1992). Human low-affinity IgG receptor FcγRIIa (CD32) introduced into mouse fibroblasts mediates phagocytosis of sensitized erythrocytes. *Blood*, 79: 1651-1656.

Tschiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T. y Yada, K., (1982), Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester, *Cancer research*, 42:1530-1536.

Vossebeld, P.J., Homburg, C.H., Schweizer, R.C., Ibarrola, I., Kessler, J., Koenderman, L., Roos, D. y Verhoeven, A.J., (1997). Tyrosine phosphorylation-dependent activation of phosphatidylinositide 3-kinase occurs upstream of Ca²⁺ signaling induced by Fcγ receptor cross-linking in human neutrophils. *Biochem. J.* 323: 87-94.

Weiss, A., (1993). T cell antigen receptor signal transduction : a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell*, 73:209-212.

Winkel, J.G. y Capel, P.A., (1993). Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunology Today*. 14: 215-221.

Wirthmueller, U., Kurosaki, T., Murakami, M.S. y Ravetch, J.V., (1992). Signal transduction by Fc γ RIII CD16 is mediated through the γ chain. *J. Exp. Med.* 175:1381-1390.

Yamanashi, Y., Kakiuchi, T., Mizuguchi, J., Yamamoto, T. y Toyoshima, K., (1991). Association of B cell antigen receptor with protein tyrosine kinase lyn. *Science* 251: 192-194.

APENDICE 1

Suero Fetal de Bovino (SFB)

El uso de este suero en cultivos celulares requiere una desactivación previa de proteínas del complemento contenidas en el suero, ya que éstas causan lisis celular. Esta desactivación se realiza con una incubación a 56°C en baño maría durante media hora.

Hanks completo

CaCl₂ 2.H₂O (Merck,Méx.), MgSO₄ (J.T.Baker, Méx), KCl (J.T.Baker, Méx) KH₂PO₄ (J.T.Baker, Méx), NaCl (Técnica química, Méx.), Na₂HPO₄ (Sigma, USA).

Sustratos enzimáticos

Sustrato para fosfatasa ácida: 4.5 mM de p-nitrofenilfosfato (Sigma, Chem. USA) en buffer de acetato de sodio [0.1 M ácido acético (J.T.Baker, Méx.), 0.05% tritón (Sigma, Chem. USA)], pH 4.5.

Sustrato para fosfatasa alcalina: 4.5 mM de p-nitrofenilfosfato (Sigma, Chem. USA) en buffer de dietanolamina [0.1 M dietanolamina, 0.05% triton (Sigma, Chem. USA)], pH 9.5.

Sustrato para β-D-glucuronidasa: 0.01 M de p-nitrophenyl β-D-glucuronido (Sigma, Chem. USA en buffer de acetato de sodio.

Buffer de lavados

95 % Buffer salino fosfato (PBS), 5 % suero fetal de bovino (SFB) (Gibco BRL, USA), 0.1 % azida de sodio. Filtrado con membrana de 0.45 µm.

PBS: 8 g de NaCl (Técnica química, Méx.), 0.2 g de KCl (J.T.Baker, Méx), 1.44 g de Na₂HPO₄ (Sigma, Chem. USA), 0.24 g KH₂PO₄ (J.T.Baker, Méx), llevar a 1 litro de agua destilada, pH. 7.4.

Paraformaldehido 1%

0.1 g de paraformaldehido se disolvieron en 4 ml de PBS, esta solución se calentó y se le adicionó NaOH, para terminar de disolver, se ajustó a pH 7.5 con HCl, se llevó a 10 ml y se filtró con una membrana de 0.45 µm.

Buffer de laemmli o buffer de la muestra

0.0625 M tris-HCl pH 6.8 (Gibco-BRL, USA), 2% dodecil sulfato de sodio (SDS) (Gibco-BRL, Life Technologies Inc, USA), 10% glicerol (Sigma, Chem. USA), 0.02% azul de bromofenol (Sigma, Chem. USA).

Gel Separador 10%

3.33 ml de una solución 30:0.8 acrilamida-N-N' metil-bisacrilamida (Gibco-BRL, Life Technologies, Inc, USA); 1.25 ml buffer del gel separador (3.0 M Tris-HCl, pH 8.8) (Gibco-BRL, USA);0.1 ml de dodecil sulfato sódico (SDS) al 10% (Gibco-BRL,

Life Technologies Inc, USA); 0.5 ml de 1.5% persulfato de amonio (Life Technologies Inc, Gibco BRL, USA); 4.8 ml de agua bidestilada; 0.015 ml de N, N, N, N-tetrametilendiamina (temed) (Gibco-BRL, Life Technologies Inc, USA).

Gel Concentrador

1.25 ml de una solución 30:08 acrilamida-N, N'metil-bisacrilamida, 2.5 ml de buffer del gel concentrador (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8); 0.1 ml de dodecil sulfato sódico al 10%; 0.5 ml de 1.5% persulfato de amonio, 5.6 ml de agua bidestilada, 0.015 ml de temed

Buffer de lisis

1% Tritón X-100 (Sigma, Chem. USA), 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7.5), 1% Aprotinina (Sigma Chem., USA), 30 mM NaF, 1 mM EDTA (Sigma, Chem. USA), 1 µg/ml Leupeptina, 1 mM Fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) (Gibco-BRL, USA), 10 mM Ortovanadato de sodio (Sigma, Chem. USA).

Buffer de lavado de inmunoprecipitación (Técnica Blots anti-PY)

0.1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7.5), 1% Aprotinina (Sigma Chem., USA), 30mM NaF, 1 mM EDTA (Sigma, Chem. USA), 1 µg/ml Leupeptina, 1mM Fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) (Gibco-BRL, USA), 10 mM Ortovanadato de sodio) (Sigma, Chem. USA).

Acoplamiento de esferas de Sefarosa-proteína A al anticuerpo anti-receptor

Se colocaron 20 µl de esferas de proteína A-Sefarosa (Gibco-BRL, USA) por tubo eppendorf, las esferas se lavaron 2 veces con 500 µl de buffer de lavado [0.1% de Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.5, 5% Glicerol (Sigma Chem., USA)], se adicionaron 3 µg de anticuerpo anti-receptor FcγRI (32.2) ó FcγRII (IV.3) por tubo más 40 µl de Buffer de lavado, se incubó en agitación durante 2 horas a 4°C. Posteriormente se lavaron las esferas 2 veces con 500 µl de buffer de lavado.

Buffer de corrida

0.25 M Tris-HCl, pH 7.5; 1.92 M glicina (Gibco-BRL, USA), 1% SDS; (pH 8.3).

Buffer de transferencia

25 mM Tris; 192 mM glicina, 0.05% SDS; 20% metanol (EM., Alemania).

TBS (Tris buffer salino)

0.15 M NaCl, 0.02 M Tris-HCl (pH 7.5), en agua destilada.

APENDICE 2

Análisis estadístico de 2 muestras: Células THP-1 creciendo en suspensión, sin tratamiento (Datos 1) y células con tratamiento 1.2% DMSO (Datos 2). La diferencia entre los tratamientos fue significativa.

	Datos 1 (Sin DMSO)	Datos 2 (Con DMSO)
Media	1351444.4	290724.8
Desviación estándar	1763541.8	213017.769
Coef. de variación %	130.4931	73.2712
T de Student	4.6040	4.6040
Mediana	1161416.5	329486
varianza	3.1101E + 12	4.5377 E + 10

Hipótesis sobre las variancias, comparación entre dos variancias				
variancia estimada de	Datos 1	3.1101E+12		
variancia estimada de	Datos 2	4.5377E+10		
Ho: $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$, riesgo $\alpha = 0.01$	
Posibles hipótesis alternas:	F de Snedecor	F de tablas	Resultado:	Decisión:
H1: $\sigma_1^2 < \sigma_2^2$	0.014590163	10.8993845	igual	Aceptar Ho
H1: $\sigma_1^2 > \sigma_2^2$	68.53932982	10.8993845	mayor	Rechazar Ho
H1: $\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$	68.53932982	15.9770934	diferente	Rechazar Ho

Análisis estadístico de 2 muestras: Células THP-1 adheridas al sustrato, sin tratamiento (Datos 1) y células con tratamiento 1.2% DMSO (Datos 2). La diferencia entre los tratamientos fue significativa.

	Datos 1 (Sin DMSO)	Datos 2 (Con DMSO)
Media	150896	14421.2
Desviación estándar	191899.216	10552.2426
Coef. de variación %	127.1731	73.1717
T de Student	4.6040	4.6040
Mediana	129990	19247.5
varianza	3.6825 E +10	111349825

Hipótesis sobre las variancias, comparación entre dos variancias				
variancia estimada de	Datos 1	3.6825E+10		
variancia estimada de	Datos 2	111349825		
Ho: $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$, riesgo $\alpha = 0.01$	
Posibles hipótesis alternas:	F de Snedecor	F de tablas	Resultado:	Decisión:
H1: $\sigma_1^2 < \sigma_2^2$	0.003023731	10.8993845	igual	Aceptar Ho
H1: $\sigma_1^2 > \sigma_2^2$	330.7172614	10.8993845	mayor	Rechazar Ho
H1: $\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$	330.7172614	15.9770934	diferente	Rechazar Ho

Análisis estadístico de 2 muestras: Células THP-1, sin tratamiento (Datos 1) y células con tratamiento 1.2% DMSO (Datos 2). Se hicieron determinaciones de la enzima fosfatasa ácida. La diferencia entre los tratamientos no fue significativa.

Hipótesis sobre las variancias, comparación entre dos variancias					
variancia estimada de	Datos 1	0.07376086			
variancia estimada de	Datos 2	0.19625196			
Ho: $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$, riesgo $\alpha = 0.01$			
Posibles hipótesis alternas:	F de Snedecor	F de tablas	Resultado:	Decisión:	
H1: $\sigma_1^2 < \sigma_2^2$	2.660651853	18.1098585	igual	Acepta Ho	
H1: $\sigma_1^2 > \sigma_2^2$					
H1: $\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$	2.660651853	29.4567144	igual	Acepta Ho	

Análisis estadístico de 2 muestras: Células THP-1, sin tratamiento (Datos 1) y células con tratamiento 1.2% DMSO (Datos 2). Se hicieron determinaciones de la enzima fosfatasa alcalina. La diferencia entre los tratamientos no fue significativa.

Hipótesis sobre las variancias, comparación entre dos variancias					
variancia estimada de	Datos 1	0.00088117			
variancia estimada de	Datos 2	0.00489242			
Ho: $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$, riesgo $\alpha = 0.01$			
Posibles hipótesis alternas:	F de Snedecor	F de tablas	Resultado:	Decisión:	
H1: $\sigma_1^2 < \sigma_2^2$	5.552160566	18.1098585	igual	Acepta Ho	
H1: $\sigma_1^2 > \sigma_2^2$					
H1: $\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$	5.552160566	29.4567144	igual	Acepta Ho	

Análisis estadístico de 2 muestras: Células THP-1, sin tratamiento (Datos 1) y células con tratamiento 1.2% DMSO (Datos 2). Se hicieron determinaciones de la enzima B-D-Glucuronidasa. La diferencia entre los tratamientos no fue significativa.

Hipótesis sobre las variancias, comparación entre dos variancias					
variancia estimada de	Datos 1	9.5199E-05			
variancia estimada de	Datos 2	0.00012587			
Ho: $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$, riesgo $\alpha = 0.01$			
Posibles hipótesis alternas:	F de Snedecor	F de tablas	Resultado:	Decisión:	
H1: $\sigma_1^2 < \sigma_2^2$	1.322123992	18.1098585	igual	Acepta Ho	
H1: $\sigma_1^2 > \sigma_2^2$					
H1: $\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$	1.322123992	29.4567144	igual	Acepta Ho	

Lista de abreviaturas utilizadas en esta tesis

32.2	Anticuerpo monoclonal para el receptor Fc γ RI.
IV.3	Anticuerpo monoclonal para el receptor Fc γ RII.
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.
AML	Leucemia mieloide aguda.
BCR	Receptor de la célula B.
C2	Dominio extracelular del receptor Fc tipo inmunoglobulina.
[Ca ²⁺] _i]	Calcio intracelular.
CD3	Antígeno CD3, está compuesto de 3 subunidades γ , δ y ϵ , se asocia al receptor de la célula T (TCR) para la expresión en superficie y la transducción de señales del receptor.
CD3 ϵ	Subunidad epsilon del antígeno CD3.
Células NK	Células asesinas naturales.
Células T	Células del timo.
CSF	Colony Stimulating Factors (Factor estimulador de colonias).
C _H 3	Dominio 3 de IgG de la región constante de la cadena pesada.
D	Aminoácido: ácido aspático.
DAG	Diacilglicerol.
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Acido desoxiribonucleico.
E	Aminoácido: ácido glutámico.
FcR	Receptores Fc (fracción cristalizable).
FcRn	Receptores Fc neonatales.
Fc γ RI (CD64)	Receptor para la fracción cristalizable de inmunoglobulina G tipo 1.
Fc γ RIA, Fc γ RIB, Fc γ RIC	Genes que codifican para el receptor Fc γ RI.
Fc γ RII (CD32)	Receptor para la fracción cristalizable de inmunoglobulina G tipo 2.
Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIC	Genes que codifican para el receptor Fc γ RII.
Fc γ RIII (CD16)	Receptor para la fracción cristalizable de inmunoglobulina G tipo 3.
Fc γ RIIIA, Fc γ RIIIB	Genes que codifican para el receptor Fc γ RIII.
Fc γ E _R	Receptores Fc para Inmonoglobulina E.
Fc μ R	Receptores Fc para Inmonoglobulina M.
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factors (Factor estimulador de colonias de granulocitos).
GM-CSF	Granulocyte-Monocyte-Colony Stimulating Factors (Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos).
GPI	Enlace glicosil-fosfatidilinositol.
HL-60	Línea celular mieloide indiferenciada, puede teñirse como mieloblasto, promielocito.
I	Aminoácido: isoleucina.
IFN- γ	Interferón gama.
IgG	Inmunoglobulina G.
IgG1	Inmunoglobulina G isotipo 1.
IgG3	Inmunoglobulina G isotipo 3.
IgSF	Superfamilia de inmunoglobulinas.
IL-1	Interleucina 1.
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif.

ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif.
IV.3	Anticuerpo monoclonal para el receptor FcγRII.
K562	Línea celular, blasto indiferenciado, con núcleo prominente y un citoplasma basófilo..
kD	Kilodaltones.
KG-1	Línea celular mielóide indiferenciada, puede teñirse como mieloblasto, promielocito, mielocito y granulocito.
L	Aminoácido: leucina.
LPS	Lipopolisacárido.
MAPK	Cinasa activadora de mitogeno.
M-CSF	Monocyte-Colony Stimulating Factors (Factor estimulador de colonias de macrofagos).
PI3-Cinasa	Fosfatidilinositol 3-Cinasa.
PIgR	Receptores poliméricos.
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.
PIP ₃	Fosfatidilinositol 1,4,5-trifosfato.
PIP4	Fosfatidilinositol 1,3,4,5-tetrafosfato.
PKC	Tirosina Cinasa C.
PLCγ1	Fosfolipasa Cγ1.
PTK	Proteína tirosina cinasa
SH2	Región de homología Src tipo 2
SH3	Región de homología Src tipo 3
TCR	Receptor de la célula T.
THP-1	Línea celular mielóide indiferenciada, similar a U937, presenta actividad naftil butirato esterasa, lisozima y fagocitosis. Tiene moléculas de histocompatibilidad clase I y II (HLA).
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa.
TPA	12- <i>o</i> -tetradecanoilforbol-13-acetato.
U937	Línea celular mielóide indiferenciada, morfológicamente es un
Monoblasto.	
Vitamina D ₃	1,25-Dihidroxivitamina D ₃ .
Y	Aminoácido: tirosina.