



03062

3

INFLUENCIA DE LA SUBCLASE DE IgG EN LA FAGOCITOSIS MEDIADA POR RECEPTORES PARA Fc.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A :

QFB. CLAUDIA ANGELICA GARAY CANALES

ASESOR: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

MÉXICO, D.F.,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JUNIO 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se desarrolló en el laboratorio y bajo la tutoría del Dr. Enrique Ortega Soto, con asesoría de la Dra. Armida Báez Saldaña, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Para su realización se contó con donativos otorgados por CONACYT (31783-N) y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM, PAPIIT IN 208399 e IN213701)

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:

DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA.

SECRETARIO:

DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO.

VOCAL:

DRA. GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO.

SUPLENTE:

DR. RAFAEL BOJALIL PARRA.

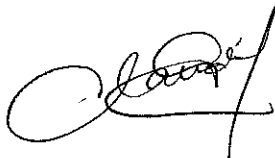
SUPLENTE:

DR. MARCO ANTONIO JOSÉ VALENZUELA.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

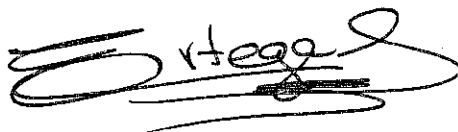
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

SUSTENTANTE:



QFB. CLAUDIA ANGELICA GARAY CANALES

ASESOR DEL TEMA:



DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

INVESTIGADOR TITULAR, DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS:

Al amor de mi vida, Beto, mi esposo, amigo, compañero y muchas otras cosas más, por las porras y el apoyo de cada día para completar este trabajo, por cuidar a las hijas, por todos nuestros momentos, sueños y metas.

A mi princesa caramelo y mi princesa bombón, Andrea y Ale, mis hijas, por ser los pequeños soles que iluminan y hacen muy feliz mi vida, por su enorme cariño, alegría y paciencia.

A mis padres por su cariño y preocupación a pesar de la distancia, por llevar una vida de trabajo y dedicación, mi ejemplo a seguir, todo mi amor, admiración y respeto.

A mis hermanos, Eri, Ale y Toño, por el cariño y todos los momentos buenos y no tan buenos que hemos compartido juntos, porque sé que siempre puedo contar con ustedes, todo mi amor.

A la nueva generación Garay, mis sobrinos consentidos, Carloch y Aram, por ser la alegría de la casa, con mucho amor.

A toda mi familia, a mi suegra por su gran ayuda con las niñas, a mis cuñis, Yaya, Blanca y Coco. A mis dos brazos Reyna y Bety.

Una dedicación especial a mi tía Chuy, por todo lo que compartimos y me enseñaste, y a todos los que ya no están conmigo.

A Enrique, por todas sus enseñanzas a lo largo de los años, con cariño.

A todos mis amiguitos del laboratorio, Hallal, Paula, Armida, José, Ilse, la Sra. Raquel y Esteban, a todos con los que he compartido amistad y trabajo a lo largo de los años en el laboratorio y en el Instituto, a los nuevos, Paola, Daniel y Linda.

CONTENIDO

	PÁGINA
RESUMEN	1
ANTECEDENTES	2
INTRODUCCION	
El macrófago	5
Expresión de receptores	6
Capacidad secretora	7
Ligando natural de los FcγR: Inmunoglobulina G	
Estructura	10
Clases de Inmunoglobulinas	12
Inmunoglobulina G	13
Subclases y diferencias	13
Región de la bisagra	15
Sitios de unión de los anticuerpos a los Fc γ R	18
Unión del anticuerpo por el antígeno	21
Receptores Fcγ:	22
Nomenclatura	23
Generalidades	23
Características y Estructura de Receptores Fc γ y cadenas asociadas:	
Subunidades de los Fc γ R	24

FcγRI	26
FcγRII	26
FcγRIII	30
ITAM	32
ITIM	34
Funciones de los FcγR:	
FcγRI	37
FcγRII	38
FcγRIII	40
Mecanismos de Endocitosis	41
Pinocitosis y Fagocitosis	41
Fagocitosis	41
Cascada de señalización en Fagocitosis	44
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA (JUSTIFICACIÓN)	48
HIPÓTESIS	50
OBJETIVOS	50
MATERIALES Y METODOS	51
RESULTADOS	63
DISCUSIÓN	85
CONCLUSIONES	97
BIBLIOGRAFÍA	98
APÉNDICE	112

ANTECEDENTES:

La función biológica de los anticuerpos involucra dos componentes: a) se unen con gran afinidad al antígeno a través de su porción Fab, y b) para la eliminación del antígeno se debe acoplar con un sistema efector a través de la porción Fc.

Existen dos tipos de sistemas effectores: a) moléculas solubles, como el sistema del complemento; y b) células effectoras, con las que interaccionan los anticuerpos a través de receptores de membrana que median la interacción entre las células y la porción Fc de los anticuerpos y se conocen como receptores Fc (FcR).

Existen receptores Fc para cada clase de anticuerpo: Fc γ R une IgG, Fc α R une IgA, Fc ϵ R une IgE, Fc μ R une IgM y Fc δ R une IgD. De éstos, el receptor para IgG es el más abundante (Unkeless et al 1988, Ravetch & Kinet 1991, Fridman 1991, Hulett & Hogart 1994). Los receptores Fc pueden unir con distintas afinidades la inmunoglobulina correspondiente, pero para iniciar una respuesta celular en contra de patógenos y antígenos solubles, es necesario el entrecruzamiento de los receptores, más que una simple ocupación de ellos.

Estos receptores bajo las condiciones apropiadas, pueden transducir señales bioquímicas al interior de la célula en las que están expresados, desencadenando una función biológica específica.

Los macrófagos constituyen un grupo de células effectoras muy importante, ya que son capaces de eliminar patógenos y partículas extrañas a través de varios procesos. Estas células expresan en su superficie, entre otros,

receptores para la porción Fc de inmunoglobulina G. La activación de macrófagos a través de estos receptores desencadena cambios funcionales que llevan a actividades bactericidas o tumoricidas, liberación de varias enzimas, metabolitos del ácido araquidónico y algunas formas reactivas del oxígeno, así como la síntesis de algunas citocinas. Los macrófagos también pueden aumentar su actividad microbicida al estar en contacto con bacterias o productos bacterianos, tales como LPS, BCG, o por citocinas provenientes de células T activadas, como el IFN- γ , etc.

Una de las principales funciones que realiza el macrófago es la fagocitosis de partículas mediada por receptores. Para discriminar entre agentes infecciosos y propios, los macrófagos han desarrollado un restringido número de receptores fagocíticos, por ejemplo el receptor de manosa, que reconoce motivos conservados en las moléculas de superficie de algunos patógenos. Los patógenos también pueden ser fagocitados por receptores de complemento, después de una opsonización inespecífica (recubrimiento de la partícula extraña con moléculas de complemento); o a través de receptores Fc γ después de la opsonización específica con anticuerpos. Estos receptores inducen rearrreglos en el citoesqueleto de actina, lo cual lleva a la internalización de la partícula. El mecanismo molecular por el que se desencadena la fagocitosis, depende del tipo de receptor que inicie la activación y del antígeno que será internalizado. Más adelante se detallará el mecanismo de activación de la fagocitosis por receptores Fc γ que es de nuestro particular interés.

Como se mencionó anteriormente, la fagocitosis mediada por receptores Fc γ , requiere que la partícula extraña se encuentre recubierta de anticuerpos. Estos acúmulos de anticuerpos sobre la partícula son capaces de entrecruzar los receptores y así activar a la célula. De ahí, la importancia que puede jugar el ligando natural, es decir la IgG, en la activación de macrófagos a través de estos receptores.

Existen varias subclases de anticuerpos IgG, tanto en humano y ratón como en otras especies. La diferencia en la secuencia de aminoácidos entre las subclases de anticuerpos IgG es mínima, existe una diferencia importante estructuralmente en la región de la bisagra, que se ha propuesto como un sitio que le confiere flexibilidad a la molécula de inmunoglobulina. También se ha propuesto que la región de la bisagra es sitio de unión a los receptores Fc γ aunque existe controversia al respecto. Estas diferencias podrían ser importantes en el contexto de activación de la célula a través de los Fc γ Rs, como ya se ha observado anteriormente para la activación de complemento (Oi et al, 1982), donde se propone que la diferente flexibilidad de las subclases de IgG puede desencadenar la activación del complemento de una manera más eficiente por unas subclases que por otras.

Es por esta razón, que nos abocamos al estudio de la capacidad de las distintas subclases de IgG para mediar la fagocitosis a través de receptores Fc γ , en macrófagos murinos.

INTRODUCCIÓN:

EL MACROFAGO

Los macrófagos se encuentran distribuidos en la mayoría de los tejidos, desempeñando un papel central en inflamación y en mecanismos de defensa del huésped. En reacciones inmunológicas, su función involucra la internalización de partículas extrañas y la presentación de antígeno a células T, también liberan moléculas moduladoras tales como: IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , TNF- β , TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, etc.

Los monocitos se generan de precursores en la médula ósea en respuesta a factores hematopoyéticos. Permanecen en circulación en promedio menos de un día y se mueven activamente a través de los vasos sanguíneos hacia los tejidos en respuesta a factores quimiotácticos, donde residen por tiempos más prolongados. En caso de daño tisular, infección o inflamación se acumulan rápidamente en este sitio para ejercer una acción reparadora o microbicida eficaz. Los monocitos que reaccionan en los compartimentos extravasculares generalmente se diferencian en macrófagos. Dependiendo de su localización en el cuerpo y de la demanda funcional, los macrófagos pueden vivir días, semanas, meses o incluso años.

Para efectuar la eliminación de partículas, el macrófago expresa receptores de superficie para un amplio rango de moléculas, que incluyen hormonas, inmunoglobulinas, proteínas de complemento (C), toxinas, citocinas, polisacáridos y lípidos. Por ejemplo, los macrófagos expresan una gran variedad de receptores de superficie para polisacáridos, que pueden reconocer

glicoproteínas provenientes de bacterias y hongos (Stahl 1992) y así eliminar levaduras y microorganismos.

La respuesta del macrófago a los estímulos puede ser de dos formas: a) internaliza el estímulo y lo somete a cambios bioquímicos característicos de procesos de endocitosis y digestión; b) expresa moléculas bioactivas que son secretadas para destruir a la partícula extraña, o bien para modular la respuesta inmune, induciendo la participación de otras células. A través de estas respuestas básicas el macrófago participa en las reacciones de inflamación e inmunológicas (Paul, 1999).

Expresión de receptores:

Los macrófagos expresan receptores que unen fragmentos Fc de IgG (Fc γ Rs) y receptores de complemento tipo 3 (CR3) que une proteínas de complemento, en particular al iC3b. La principal función de ambos tipos de receptores es promover la internalización de moléculas extrañas cubiertas con anticuerpos o con proteínas del complemento. Ambos receptores pueden actuar sinérgicamente para incrementar, por varios cientos de veces, la velocidad de entrada de una partícula opsonizada. Tanto los Fc γ R, como el CR3, son esenciales para la eliminación de microorganismos y de complejos inmunes del torrente sanguíneo, sobretodo en hígado y en bazo. Los Fc γ Rs y el CR3 también están involucrados en mediar el fenómeno de ADCC (Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo). En la ADCC, una célula blanco cubierta con anticuerpo o iC3b es eliminada después de la unión al macrófago, a través de su respectivo receptor.

Capacidad Secretora:

En la Tabla I se muestra el alto potencial secretor del macrófago. La variedad de moléculas secretadas es amplia, y varía de pequeños lípidos derivados del araquidonato (prostaglandina E₂, tromboxano y leucotrienos) a moléculas promotoras del crecimiento, proteínas del complemento y enzimas (Unanue 1981, Takemura & Werb 1984, Auger & Ross 1992). También está involucrado en la generación de aniones superóxido y otros metabolitos reactivos del oxígeno (Susuki T 1991). Esta variedad de moléculas tiene efectos diferentes, dependiendo de la anatomía y fisiología del tejido que se trate, participando así en la homeostasis tisular. La mayor parte de estas moléculas secretadas son liberadas después de la estimulación y activación del macrófago. La cantidad y el tipo de las moléculas secretadas puede variar entre macrófagos de diferentes tejidos, dependiendo de su estado de diferenciación.

Las prostaglandinas son mediadores secretados por macrófagos y monocitos en los procesos de inflamación. Tienen efecto no solo sobre la permeabilidad vascular sino también sobre los mismos macrófagos. La prostaglandina E₂, por ejemplo, inhibe la activación del macrófago inducida por IFN- γ . Los macrófagos producen cantidades relativamente grandes de prostaglandinas, con variaciones entre las distintas poblaciones de macrófagos (Scott et al 1982, Tripp et al 1986).

Los macrófagos liberan enzimas que afectan proteínas del tejido conectivo como son: colagenasas, elastasas y activadores de plasminógeno. También

secretan apolipoproteína E, lipoproteína de plasma que participa en transporte de lípidos y juega un papel inhibitorio en reacciones inmunológicas *in vitro*.

TABLA (I): PRODUCTOS SECRETADOS POR MACRÓFAGOS^a.

Enzimas que afectan el tejido conectivo y proteínas del suero:

Elastasa
Activador de Plasminógeno
Colagenasa
Enzimas lisosomales
Enzima convertidora de angiotensina
Procoagulante de tejido
Arginasa

Proteínas involucradas en defensa e inflamación:

Proteínas de complemento
C2, C3, C4, C5
Factor B y D
Factor H e I

Lisozima
Interferon α y β
Fibronectina

Factores reguladores de crecimiento:

G-CSF
GM-CSF
M-CSF

Citocinas que promueven inflamación aguda y regulan la respuesta de linfocitos:

IL-1
IL-6
TNF- α
TNF- β
IL-8
IL-12

Citocinas inhibidoras:

IL-10
TGF- β 1, -2, -3
Antagonista del receptor de IL-1

Factores que promueven la reparación de tejido:

Factor de crecimiento derivado de plaquetas
Factor de crecimiento de fibroblastos

Otros:

Apolipoproteína E
Derivados del Araquidonato
Factor activador de plaquetas
Metabolitos del oxígeno
Timidina
Óxido nítrico

^a Esta tabla es un resumen seleccionado con los principales productos liberados por los macrófagos (Lewis & McGee, 1992).

Otras moléculas clave liberadas por el macrófago son las citocinas (Unanue 1981, Takemura et al 1984, Auger et al 1992). Las citocinas liberadas por el macrófago se pueden clasificar en tres categorías: 1) Aquellas que promueven o inician una respuesta inflamatoria aguda, así como una respuesta de linfocitos; estas incluyen IL-1, TNF, IL-6 y varias proteínas quimiotácticas como IL-8 e IL-12 (Wolpe et al 1989, Oppenheim et al 1991). Después de la internalización de un amplio rango de bacterias y virus, los macrófagos tisulares responden rápidamente liberando estas citocinas. 2) Aquellas que inhiben la respuesta de linfocitos y la inflamación en general. Entre éstas se encuentran IL-10 (de Vries 1991), TGF- β (Assoian et al, 1987) y el receptor antagonista de IL-1 (Arend et al, 1990). Estas citocinas tienden a ser liberadas más tarde, después de la estimulación y sirven para disminuir o controlar la respuesta. 3) Aquellas citocinas que promueven la reparación de tejido y la homeostasis después o durante inflamación, como el PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y el FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), ambos inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos. Todas estas moléculas son secretadas después de la internalización de productos microbianos, o bien, de partículas opsonizadas por iC3b o IgG.

Otras proteínas secretadas por macrófagos son la lisozima y los interferones α y β , involucrados en procesos de defensa del huésped. Otras moléculas importantes son los intermediarios reactivos del oxígeno (Nathan & Tsunawaki 1986) así como óxido nítrico (Green et al 1991). Ambos compuestos son cruciales en la eliminación de microorganismos patógenos intracelulares.

LIGANDO NATURAL DE LOS F_{cy}R: INMUNOGLOBULINA G

Estructura:

La unidad fundamental en la estructura de los anticuerpos se muestra en el diagrama de la Figura 1. Esta estructura consiste en dos pares de cadenas polipeptídicas: un par de cadenas "pesadas", que constan de cuatro o cinco secuencias homólogas cada una de aproximadamente 110 residuos de aminoácidos en longitud, y un par de cadenas "ligeras", cada una consiste en dos segmentos homólogos. Cada segmento homólogo se pliega de una manera similar para formar una estructura compacta independiente llamada "dominio". El dominio amino-terminal de cada uno de los polipéptidos – el dominio variable de la cadena ligera, V_L, y el dominio variable de la correspondiente cadena pesada, V_H – interaccionan para formar un módulo variable conocido como la región F_v (o "fragmento" cuando es preparado por proteólisis de anticuerpos intactos). Sigue un dominio constante de cada cadena ligera, C_L, que interacciona con el primer dominio constante C_{H1}, de la correspondiente cadena pesada. Las interacciones no-covalentes entre estos dominios a menudo se ven reforzadas con puentes disulfuro entre los dos dominios. Juntos, cada juego de estos cuatro dominios (V_L, V_H, C_L y C_{H1}), forman una unidad llamada región o fragmento Fab; hay dos de tales unidades en la estructura general de los anticuerpos. Más adelante en dirección del carboxi-terminal, el dominio C_{H2} de las cadenas pesadas se empalma. Sin embargo, la interfase entre ellas está saturada con carbohidratos, que de no ser por otras

interacciones, estos dos dominios no se asociarían. Finalmente, se encuentran los dos dominios CH3 que interaccionan fuertemente entre sí.

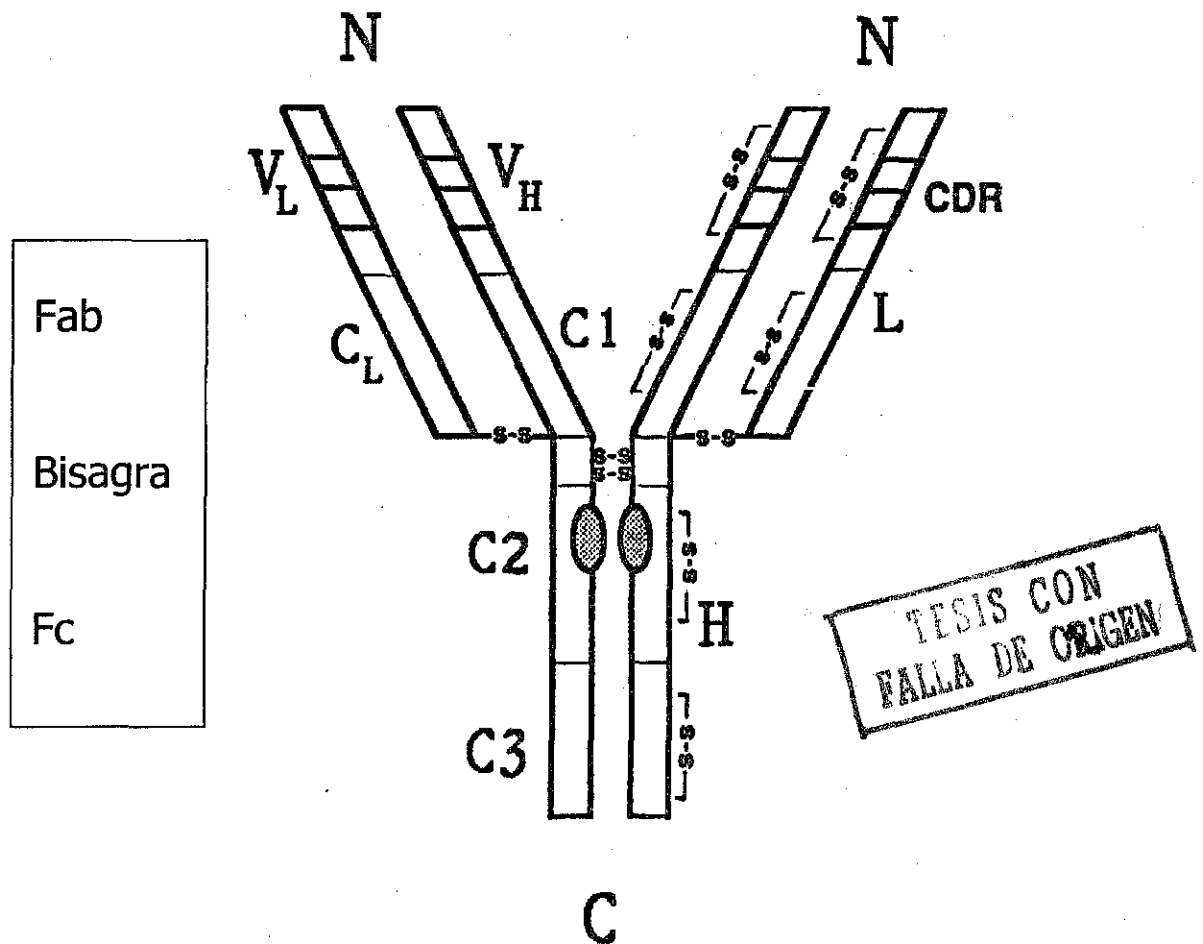


Figura 1. La estructura básica de las cuatro cadenas de la molécula de inmunoglobulina. H y L, las cadenas peptídicas, pesada y ligera; N y C, extremos amino y carboxi-terminal; V_L y V_H , regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas; C1, C2, y C3, regiones de homología (dominios) de las cadenas pesadas; CDR, región determinante de complementariedad. Se muestra la distribución de los puentes disulfuro intercadena e intracadena. Los óvalos sombreados muestran la localización de oligosacáridos en el dominio C_{H2} (Nezlin 1994).

Entre las secuencias de C_{H1} y C_{H2} las inmunoglobulinas tienen una secuencia denominada "bisagra", la cual puede tener más de 60 residuos de longitud y es rica en prolina y cisteína, ésta última forma generalmente puentes disulfuro con su similar en la otra cadena. La región de la bisagra le confiere a

la molécula de inmunoglobulina cierto grado de libertad de rotación o de flexibilidad, que depende de la secuencia específica, como se detallará más adelante, los dos extremos de esta región son generalmente la parte de la molécula de anticuerpo más susceptibles a ataques proteolíticos. Si la proteólisis ocurre en el extremo amino terminal de la secuencia de la bisagra, se producen generalmente dos fragmentos Fab y un solo fragmento "Fc", esto se logra con enzimas como la papaína. Si el corte ocurre en el extremo carboxi-terminal de la región de la bisagra unida por puente disulfuro, se genera un solo fragmento $F(ab')_2$, siendo la pepsina la proteasa más efectiva. Esta enzima corta la región Fc en fragmentos más pequeños (Metzger 1974)

Clases de Inmunoglobulinas:

En humanos y roedores, existen cinco clases de inmunoglobulinas, que difieren en la estructura primaria, contenido de carbohidratos y propiedades antigénicas de la cadena pesada. Estas cinco clases de anticuerpos son: IgM, IgD, IgG, IgE e IgA. La clase de inmunoglobulina está determinada por su cadena pesada, que puede ser del tipo μ , δ , γ , ϵ y α respectivamente. Existen dos tipos de cadena ligera para todas las clases de inmunoglobulinas. Cada molécula de inmunoglobulina, contiene cadenas ligeras de uno de los dos tipos, ya sea lambda (λ) o kappa (κ). Las cadenas λ y κ tienen una estructura primaria y propiedades antigénicas diferentes y generalmente no contienen carbohidratos.

Inmunoglobulina G:

La inmunoglobulina G (IgG) es la más abundante ya que cerca de tres cuartas partes de todas las inmunoglobulinas del suero pertenecen a esta clase. Se han realizado gran cantidad de estudios para describir la estructura tridimensional y cristalográfica de las inmunoglobulinas.

Las moléculas de IgG consisten en dos cadenas pesadas γ y dos cadenas ligeras. Cada molécula de IgG tiene dos sitios idénticos de combinación con el antígeno y contiene cerca de 3% de carbohidratos. Después de una inmunización secundaria, las células plasmáticas secretan predominantemente moléculas de IgG, que a diferencia de otras inmunoglobulinas, pueden cruzar la barrera placentaria y pueden penetrar en las áreas extravasculares; son capaces de reaccionar con los receptores Fc γ presentes en macrófagos y otras células hematopoyéticas y desencadenar una función efectora en contra de patógenos o partículas extrañas al organismo. Las moléculas de IgG también son capaces de activar complemento por la vía clásica.

Subclases y diferencias:

Se han descrito a la fecha cuatro subclases de IgG murinas, siendo IgG1 e IgG2a las más abundantes, e IgG2b e IgG3 las menos abundantes. Estas subclases difieren entre sí en la estructura de la región constante de su cadena pesada, incluyendo diferencias en la longitud y número de puentes disulfuro en la región de la bisagra; también difieren en sus propiedades funcionales. Las cadenas pesadas de IgG3 están unidas por dos puentes disulfuro intercadena, mientras que las otras moléculas de IgG forman tres puentes. Las diferentes

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

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

Las moléculas de IgG1 pueden mediar reacciones de anafilaxia cutánea pasiva (PCA) en ratón, pero las moléculas de IgG2 son capaces de mediar PCA en conejillos de indias (Urbanek R, 1988). Los isotipos IgG2a e IgG2b de ratón son eficientes en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (Nezlin 1998).

Diferentes estímulos antigénicos inducen la producción preferente de algunas subclases de IgG. Antígenos en forma de proteínas solubles estimulan predominantemente una respuesta de IgG1 en ratón (Slack et al 1980), mientras que antígenos de carbohidratos inducen sustancialmente a una respuesta de IgG3 en el ratón, y una respuesta IgG2 en humano. Los virus inducen principalmente respuesta IgG2a en ratones, e IgG1 e IgG3 en humanos. Bacterias gram-negativas inducen IgG2a y en algunos casos IgG3 en ratón. Los parásitos nemátodos inducen predominantemente respuesta IgG1 en ratón e IgG4 en humano (Nezlin 1998).

Como se mencionó anteriormente, aunque la estructura y secuencia de las diferentes subclases es muy semejante, existen diferencias importantes en su función tanto *in vitro* como *in vivo*. Debido a que la diferencia entre las

subclases, radica fundamentalmente en la región de la bisagra, es importante revisar la estructura de ésta más a fondo para tratar de entender el papel que juega la flexibilidad de la molécula en la activación celular.

En estudios donde se determina la flexibilidad de la inmunoglobulina por ensayos de depolarización de fluorescencia, se ha observado que a mayor flexibilidad de la molécula, mayor eficiencia para mediar la fijación de complemento (Oi et al, 1984). En este reporte, para descartar la participación de la región variable del anticuerpo en la flexibilidad se utilizaron anticuerpos diseñados genéticamente, con una porción variable de reconocimiento de antígeno idéntica, pero con cambios en la región de la bisagra correspondientes a las distintas subclases en humanos. Así se demostró que la diferencia en la capacidad para fijar complemento se debía a la flexibilidad de la molécula, donde la región de la bisagra es la responsable (Roux et al, 1997).

Región de la bisagra:

Mucho se sabe acerca de la composición de las porciones más rígidas (Fab y Fc) de la molécula, como resultado del uso de cristalografía de rayos X y otras técnicas fisicoquímicas (Nezlin R, 1990). En contraste, poco se sabe acerca de la región flexible de la molécula debido a la dificultad para cuantificar las diferentes clases de flexibilidad molecular. El mediador principal de la flexibilidad segmental en la IgG es la región de la bisagra

La región de la bisagra une los dos brazos Fab a la porción Fc de la molécula de IgG y contiene puentes disulfuro que unen covalentemente las dos cadenas pesadas. Es codificada generalmente por exones únicos. Las subclases

de IgG humanas muestran en su estructura general, una mayor homología entre sí que las subclases de IgG murinas (~95 vs ~80%). En contraste, en la región de la bisagra las subclases de IgG de ambas especies son solo ~70% homólogas.

Estructuralmente, la bisagra consiste en segmentos extendidos de péptidos diméricos unidos por varios puentes disulfuro, ricos en prolinas, serinas y treoninas. Esta composición de aminoácidos le da a la bisagra flexibilidad y a los fragmentos Fab del anticuerpo una movilidad flexional (Wade et al 1989) y torsional (Edmundson A 1993) como se muestra en la Fig. 2.

La bisagra proporciona un espacio entre los fragmentos Fab y Fc y por tanto, una cierta libertad de movimiento. Se ha propuesto que esta propiedad le confiere a la IgG, una capacidad diferente para iniciar la activación celular llevando a la lisis celular mediada por complemento (Feinstein et al 1986).

La flexibilidad de la bisagra permite a los Fabs adoptar diferentes conformaciones y así poder unirse a epítopes bivalentemente –presumiblemente dándole al anticuerpo mayor avidéz y versatilidad. El grado de flexibilidad permitido correlaciona fuertemente con la longitud de la bisagra entre el extremo de CH1 y el primer puente disulfuro intercadena pesada (conocido como bisagra alta), así se explica que IgG3 que es más larga en esta región sea más flexible que la IgG1. La longitud de la bisagra y su flexibilidad también reducen el impedimento estérico que los Fabs presentan para el acceso al CH2 por otras moléculas.

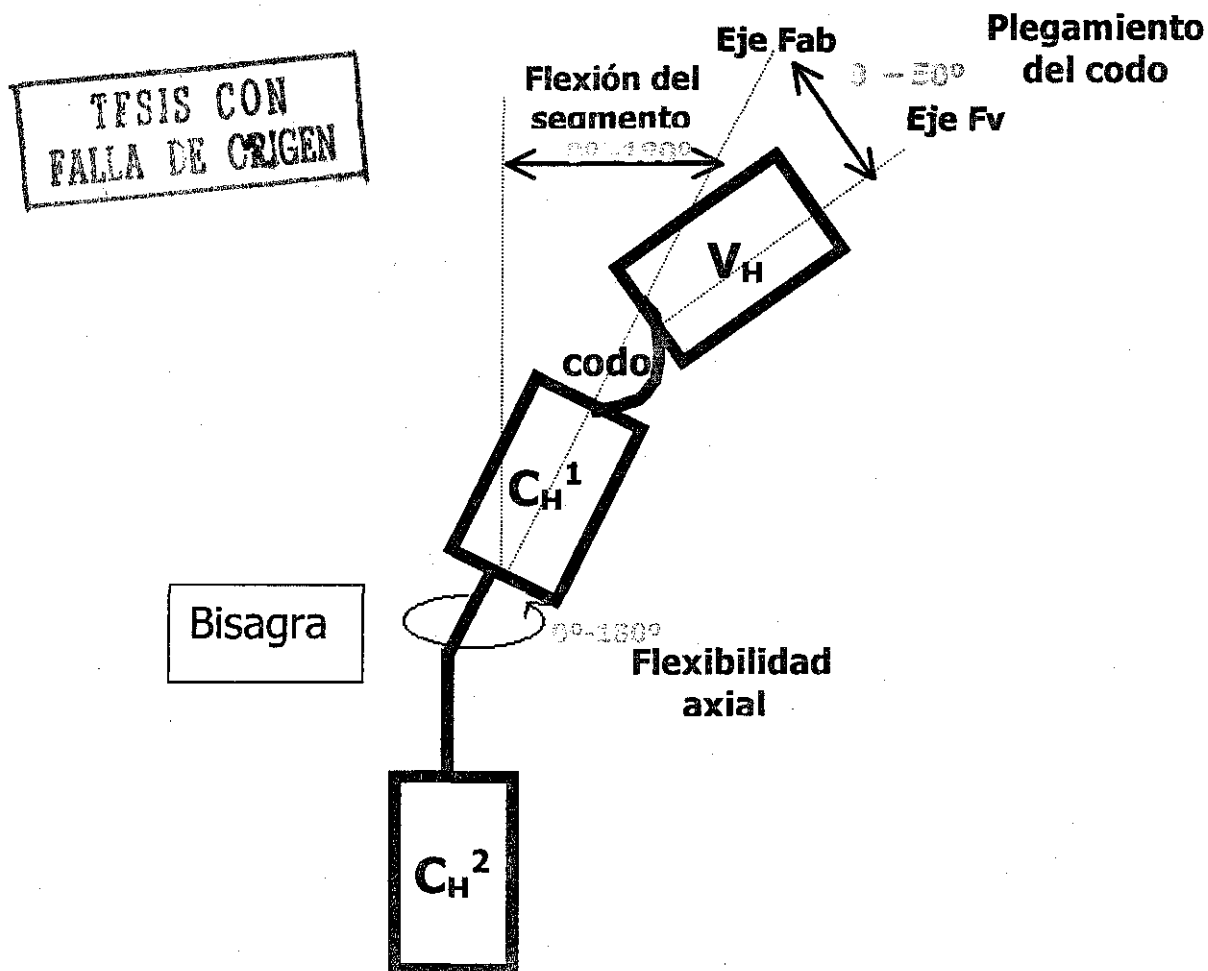


Fig. 2. Esquema de la movilidad del Fab. Los dominios están representados dentro de cajas. La flexibilidad segmental está determinada por la bisagra y se mide como el ángulo entre los ejes simétricos del Fc y Fab; la microscopía electrónica revela ángulos entre 0 y 180 grados. La flexibilidad axial también está determinada por la bisagra y da giros sobre el eje de Fab. El plegamiento del codo está determinado por el giro de péptidos y se mide convencionalmente como el ángulo entre los ejes simétricos Fv y Fab con rangos entre 130 y 180 grados.

La bisagra puede ser dividida en tres regiones, la superior, la media, y la baja bisagra. La bisagra superior ha sido definida por Burton (et al 1987) como los aminoácidos entre el extremo del CH1 y la primera cisteína que forma un puente disulfuro intercadena pesada. Una bisagra superior larga permitirá gran flexibilidad segmental y el ángulo entre los brazos Fab puede variar

ampliamente, mientras que una bisagra superior corta permite una movilidad menor de los brazos Fab.

Todas las secuencias de la bisagra media de IgG tienen centros de poliprolina similares y probablemente adopte la estructura de poliprolina. La bisagra media puede tener varias funciones. Contiene las cisteínas que participan en los puentes disulfuro y por tanto contienen los residuos que mantienen los dos dominios CH₂ juntos en el extremo amino-terminal. También el centro con forma de bastón rígido proporciona espacio o distancia entre la unión del antígeno y el dominio efector. La bisagra es codificada por un mismo exón para la bisagra superior y media, mientras que la bisagra baja es codificada por el exón de CH₂.

Sitios de unión de los anticuerpos a los FcγR:

Se han identificado algunos sitios que pueden mediar la interacción de la IgG humana con los receptores FcγRI y FcγRII utilizando análisis mutacionales (Lund et al 1991b); los residuos 234-237 (Leu-Leu-Gly-Gly), presentes en el extremo amino terminal del dominio CH₂ humano (región de bisagra baja), es crítica para las interacciones IgG-FcγRI. Mutaciones en la posición 235 cambian dramáticamente el reconocimiento por el FcγRI. Mutaciones en la posición 234 y 237 disminuyen la capacidad de la IgG para reaccionar con el FcγRII. La segunda región importante para la unión del receptor es una vuelta próxima a la bisagra entre las dos hojas β de CH₂ (particularmente residuos en posición 331, prolina en IgG1 e IgG3 humana, pero serina en IgG4) (Canfield 1991). Es por esto, que todos los receptores Fcγ, incluyendo los de baja

afinidad FcγRII y FcγRIII, parecen reconocer casi el mismo sitio de CH2 (Sarmay et al 1992). La secuencia Leu-Leu-Gly-Gly en posiciones 234-237 es el motivo óptimo para estas interacciones. Esta presente en las subclases humanas IgG1 e IgG3, y en ratón en la IgG2a e IgG2b. Al contrario, la poco reactiva IgG4 o no reactiva IgG2 en humano tienen Phe-Leu-Gly-Gly, y Val-Ala-delección-Gly, respectivamente, en la posición 234-237 de la cadena γ. Dos sitios han sido identificados en el CH2 para el FcγRII murino (Lund et al 1991a). Tres mutantes de IgG (Gly 237 →Ala, Asn-297 →Ala, y Glu 318 →Ala) no se unen al FcγRII, ni en forma de complejo, ni en forma monomérica. Una molécula de oligosacárido alterada de CH2 afecta la capacidad de la IgG para reaccionar con los FcγRs, probablemente por influencia de la estructura local en el sitio de unión (Jefferis et al 1997).

Aunque los reportes anteriores indican una clara participación de la región baja de la bisagra en su unión a los FcγR existen también reportes en los que indican que la unión es más bien entre el dominio CH2 y CH3. Una quimera entre IgG4, la cual se une débilmente al FcγRIII, y la mitad carboxi-terminal del dominio CH2 de IgG1, es suficiente para la inducción de ADCC (Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo) por el FcγRIII (Greenwood et al 1993). En experimentos con células que contienen FcγR, puede inhibirse la unión de complejos inmunes a los receptores con proteína A; se ha identificado por estudios de cristalografía que la proteína A se une al anticuerpo en una región entre el dominio CH2 y CH3 (Deisenhofer, 1981); (Ades et al 1976) lo que

sugiere que la proteína A y los FcγRs comparten al menos parcialmente el sitio de unión al anticuerpo.

A partir de la estructura cristalizada del complejo FcγRII y la IgG se propuso un modelo utilizando el programa FTDock (Gabb et al 1997) en el que el FcγRIIb se une entre la hendidura de los dominios CH2 y CH3 de la IgG, con una estequiometría 2:1 entre el FcγRIIb y los fragmentos Fc en el complejo, como se demostró en experimentos de equilibrio de filtración en gel (Sonderman et al 1999b). El complejo FcγR - anticuerpo estaría orientado hacia arriba en la membrana, permitiendo máxima libertad de conformación de los brazos Fab para estar enlazados en la unión con el antígeno. Por el contrario, un arreglo que emplea la parte baja de la bisagra como región de unión forzaría, debido a la distancia fija entre la membrana y el sitio de unión en la molécula del FcγR, un complejo paralelo a la membrana lo que provocaría una restringida libertad de movimiento para los brazos Fab. Este modelo es controversial y distinto al propuesto por Maxwell et al 1999, donde la unión del anticuerpo con el receptor se da en la región baja de la bisagra apoyado por análisis mutacional.

Los modelos que apoyan la unión de la inmunoglobulina a través de la región de la bisagra, dada por la evidencia de que pequeños cambios en aminoácidos en los residuos 234-237, abaten la unión, pueden estar descartando la posibilidad de que estas mutaciones estén modificando la conformación de la molécula y así cambiando el sitio de unión.

Unión del anticuerpo con el antígeno:

Los sitios de combinación del anticuerpo con el antígeno están formados exclusivamente por cadenas laterales de aminoácidos en los dominios de la región variable de las cadenas pesada y ligera. El número y tipo de los enlaces no covalentes que se forman entre estas cadenas laterales y los átomos correspondientes en el antígeno (el "epítipo") determina la afinidad intrínseca (K_a) de los sitios de combinación para el epítipo. Otros aspectos de la estructura del anticuerpo contribuyen a la estabilidad de la interacción antígeno-anticuerpo: la multivalencia de anticuerpos, la diversidad de sitios de combinación, el tamaño y la flexibilidad de las moléculas (Metzger, 1986).

Muchos patógenos contienen epítipes repetidos. El anticuerpo tiene al menos dos sitios de combinación, y es capaz de unir bivalentemente al antígeno. La fuerza promedio de esta interacción ("avidéz" del anticuerpo por el antígeno) puede ser mayor que la afinidad intrínseca de los sitios combinables individuales para un solo epítipo, bajo condiciones favorables, tan grande como $(K_a)^2$ (Crothers & Metzger 1972, Karush 1976).

Si la molécula de anticuerpo fuera totalmente rígida, la posibilidad de que se uniera multivalentemente al antígeno sería muy pequeña, ya que se requeriría una correspondencia fortuita de la distancia entre los dos sitios de combinación del anticuerpo y entre los epítipes en el antígeno. La relativa flexibilidad del anticuerpo en los extremos de la región de la bisagra, relaja esta restricción y disminuye el umbral de energía requerido para una unión multivalente.

RECEPTORES Fc γ

Los receptores para el Fc de la IgG (Fc γ R) constituyen una familia de receptores que se unen específicamente a IgG a través del dominio Fc y así pueden mediar funciones fisiológicas importantes en inmunidad. Este papel puede ser agrupado en tres áreas: defensa inmune celular y regulación de linfocitos, transcitosis de inmunoglobulinas y patología autoinmune.

Los receptores Fc (Fc γ R) juegan un papel clave en la defensa del huésped en contra de infecciones. Una vez que el patógeno ha llegado al torrente sanguíneo es opsonizado (cubierto) por inmunoglobulinas (Igs). Debido a su multivalencia, los inmuno-complejos resultantes se unen con una alta avidéz a las células que expresan los FcR. La partícula opsonizada con IgG, provoca el entrecruzamiento de los Fc γ Rs, los cuales desencadenan varias funciones efectoras (Metzger 1992), entre las que se encuentran: endocitosis, presentación de antígeno, ADCC (Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo), fagocitosis, secreción de varios mediadores como citocinas, hidrolasas lisosomales, metabolitos reactivos del oxígeno, metabolitos del ácido araquidónico y otros mediadores de inflamación (Fridman et al 1992, van de Winkel & Capel 1993). Los receptores participan en la regulación de linfocitos, mediante la liberación de una gran cantidad de citocinas.

El receptor responsable de la transcitosis, se denomina FcRn (Raghavan & Bjorkman 1996) y se expresa en células epiteliales intestinales de lactantes. La IgG presente en la leche materna se une al FcRn localizado en la parte apical de estas células y la transporta a la superficie basolateral de las células donde

es liberada al torrente sanguíneo. Esta transferencia de la IgG materna, proporciona inmunidad humoral los primeros días de vida al recién nacido.

Existen enfermedades autoinmunes tanto en ratón como en humano, ya sea debido a una disfunción de los Fc γ R en macrófagos (Hoffman et al 1989), o por presencia de altos títulos de inmunoglobulinas anti-Fc γ R. En pacientes con artritis reumatoide, se encuentran autoanticuerpos con especificidad por Fc γ (factor reumatoide), formando complejos en suero o líquido sinovial lo que induce daño al tejido, activando la cascada de complemento e inflamación.

Nomenclatura:

La nomenclatura oficial para la familia de los receptores Fc fue acordada en junio de 1987. La especie animal de la célula que expresa el FcR se designa con dos letras de la abreviación en minúsculas. Se agrega la palabra Fc, seguida de la principal clase de inmunoglobulina que se une al receptor utilizando una letra griega subscripta. A continuación, se coloca un número romano para la subclase del receptor; ésta se basa en la similaridad estructural y reactividad que presenta el receptor con anticuerpos monoclonales. Después se designan los distintos genes con una letra mayúscula. Por último, el número arábigo subscripto se refiere a cada forma de splicing alternativo.

Generalidades:

Existen tres tipos de receptores Fc para IgG: Fc γ RI(CD64), Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16). Se expresan en las células como proteínas transmembranales, en forma soluble (sFc γ R) o como el Fc γ RIIIb que se ancla a la membrana a través del glicosilfosfatidilinositol.

La porción extracelular de los FcγR consiste en tres (FcγRI,) o dos (FcγRII, FcγRIII) dominios semejantes a la inmunoglobulina (~110 kDa/dominio); pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Los FcγRs son muy semejantes estructuralmente entre sí. Estos receptores altamente glicosilados son homólogos y la identidad total en la secuencia de aminoácidos entre los FcγRs sobrepasa el 50% en su región extracelular. Sin embargo, la afinidad de los FcγR por su ligando varía ampliamente. La mayor constante de afinidad de 10^8 M^{-1} aproximadamente del FcγRI por los fragmentos Fc parece ser gracias a su tercer dominio, mientras que los otros FcγRs con dos dominios tienen una constante de afinidad para la IgG que varía entre 10^5 y 10^7 M^{-1} (Metzger 1992b).

Una misma célula puede expresar más de un tipo de FcγR. La expresión del FcγRI en monocitos no es vital (Ceuppens et al 1988), por otra parte, el FcγRIIIa requiere para su expresión en la superficie de la célula, la coexpresión de proteínas asociadas como las cadenas γ.

Características y Estructura de Receptores Fcγ y Cadenas Asociadas:

Subunidades de los FcγRs:

Existe una alta homología estructural entre los diferentes miembros de la familia de los FcγR, que se localizan en la célula efectora y son capaces de iniciar la activación celular. La estructura comprende una subunidad α que determina la especificidad de isotipo y afinidad de la reacción con el Fc, y que puede unirse no covalentemente a dos cadenas accesorias (γ ó ζ) que definen las propiedades de señalización y llevan el motivo de activación basado en

tirosina (ITAM); el Fc γ RII tiene dentro de su cadena α el motivo ITAM o el motivo de inhibición basado en tirosina (ITIM) los cuales se detallarán posteriormente.

La subunidad α está compuesta por dos o tres dominios parecidos a inmunoglobulina. Existen varias isoformas de Fc γ R en humanos, los cuales difieren en la estructura de su subunidad α , modo de anclaje a la membrana y función. La heterogeneidad de los Fc γ R murinos es menor.

La cadena γ es una proteína transmembranal de 12 kDa, común para varios Fc γ R y necesaria para la expresión y ensamblaje de los FcR que la contienen (Nezlin R, 1998). Se ha encontrado que las cadenas γ asociadas evitan la degradación del complejo Fc γ RIIIA en retículo endoplásmico (Kurosaki et al 1991), y son esenciales para la transducción de señales (Wirthmueller et al 1992). El análisis del Fc γ RIIIA en células cebadas, reveló que la cadena β del Fc ϵ RI, puede formar complejos con el Fc γ RIIIA cuando tiene asociados homodímeros (γ - γ) (Kurosaki et al 1992). Al parecer, el Fc γ RI se encuentra también asociado con homodímeros de cadena γ en células U937 diferenciadas (pero no en células no diferenciadas), así como en monocitos; por lo que la asociación con γ no es esencial para su expresión en membrana, pero su papel en la transducción de señales por el Fc γ RI parece ser similar (Ernst et al 1993). Macrófagos derivados de ratones knock out que no expresan γ , son incapaces de unir IgG2a, lo que sugiere que γ es necesaria para la expresión de α y posiblemente para la función de Fc γ RI *in vivo* (Takai et al 1994).

Fc γ RI

El huFc γ RI es una glicoproteína de 72 kDa capaz de unir IgG monomérica con alta afinidad. El Fc γ RI se expresa en la superficie de macrófagos y monocitos constitutivamente y su expresión puede ser inducida en neutrófilos y granulocitos (van de Winkel et al 1991, Hulett et al 1994). El Fc γ RI posee una región extracelular de 292 aminoácidos con tres dominios semejantes a inmunoglobulinas, una región transmembranal de 21 aminoácidos, y una cola citoplasmática de 61 aminoácidos (Fig 3, estructura de los Fc γ Rs). El tercer dominio extracelular es único para el Fc γ RI, ya que no se encuentra en los Fc γ RII y III (Ernst et al 1992). Se han identificado tres genes humanos homólogos (>98% de identidad nucleotídica) para el Fc γ RI: Fc γ RIA, Fc γ RIB y Fc γ RIC; localizados en el cromosoma 1 (Sears et al 1990). Los genes del Fc γ RI constan de seis exones, dos codifican el péptido señal, un exón para cada dominio semejante a inmunoglobulina, y un exón para la región combinada transmembranal/citoplasmática. De estos tres genes identificados, uno codifica un receptor transmembranal, y dos codifican receptores solubles (Allen & Seed 1989).

Fc γ RII

El Fc γ RII es una glicoproteína de 40 kDa y es el receptor más ampliamente distribuido entre las células del sistema inmune, estando presente en monocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos B, megacariocitos y plaquetas (van de Winkel & Anderson 1991, Hulett & Hogarth 1994).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

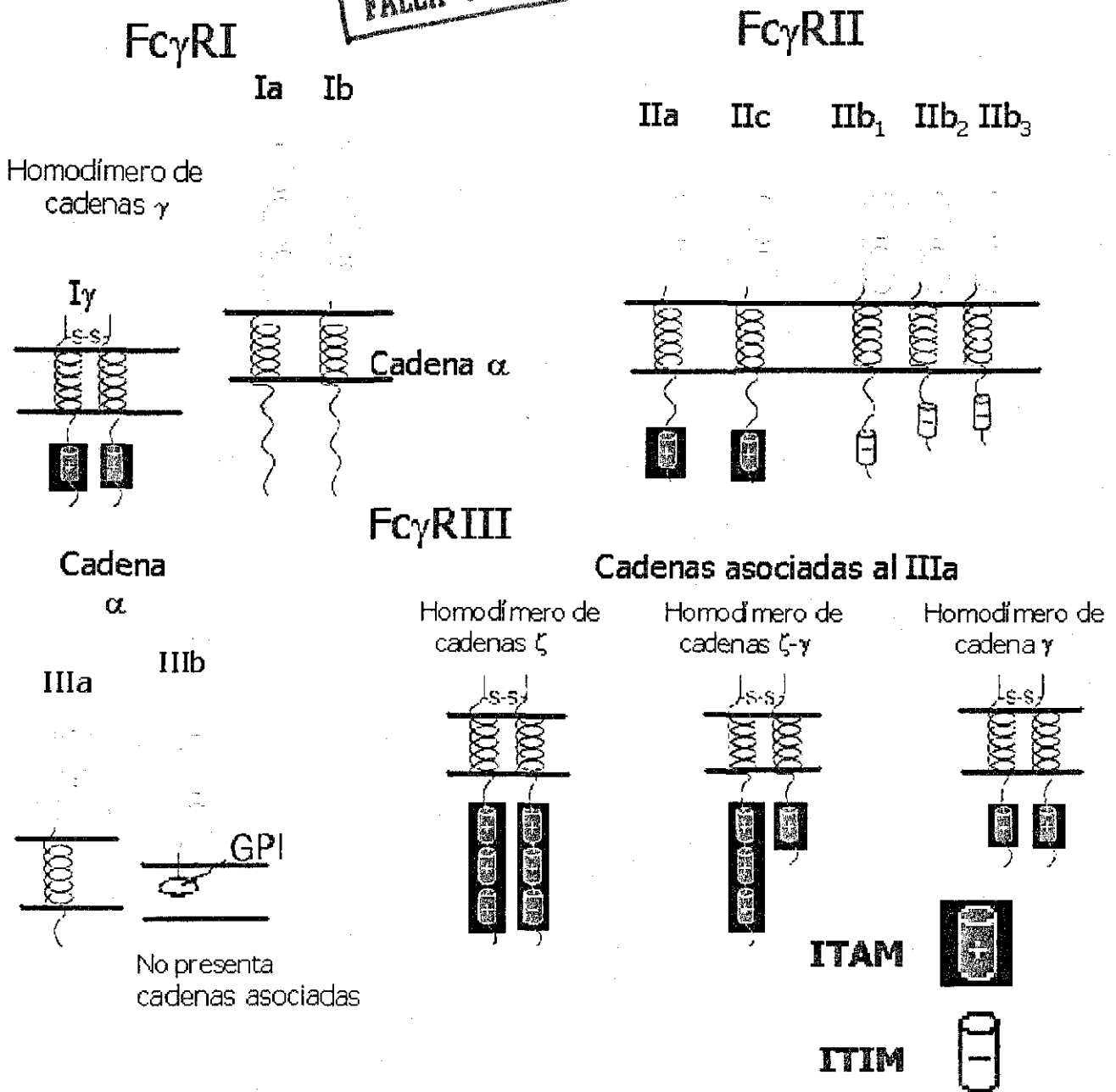


Fig 3. Estructura de los FcγR. Esquema de los receptores para la porción Fc de IgG, mostrando los dominios parecidos a inmunoglobulinas como óvalos en la región extracelular; las regiones transmembranales están delimitadas por líneas. Los receptores tipo I y III se muestran con sus cadenas asociadas. Los secuencias consenso de tirosinas presentes en los receptores tipo II y en cadenas asociadas se señalan como motivos ITAM (marcados en recuadro) y los motivos ITIM (en cilindro).

El Fc γ RII es el producto de tres genes distintos pero homólogos en humanos y uno en murino (Ravetch et al 1986, Brooks et al 1989, Stuart et al 1989) los cuales codifican al menos seis isoformas de transcritos que difieren principalmente en su región citoplasmática (Ravetch et al 1991, Cassel et al, 1993). Los genes son Fc γ RIIA, Fc γ RIIB y Fc γ RIIC. El gene de Fc γ RIIA, da origen a dos transcritos: Fc γ RIIa1, con dominio transmembranal, y el Fc γ RIIa2, que carece de él. El gene del Fc γ RIIB, genera tres isoformas, Fc γ RIIb1, Fc γ RIIb2 y Fc γ RIIb3, generados por splicing diferencial y poliadenilación alternativa.

El Fc γ RII se une a IgG monomérica con afinidad muy baja o no detectable ($K_A < 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ estimada para la unión del Fc γ RII humano a IgG; Hulett & Hogarth 1994). Bajo condiciones fisiológicas, la baja afinidad del Fc γ RII para IgG monomérica asegura que este receptor (y el Fc γ RIII) interaccionan solo con IgG que ha sido agregada por la unión a antígenos multivalentes. Esta baja afinidad hace controversial el cálculo de la afinidad de las distintas subclases por este receptor, ya que esto depende del agregado que se produzca.

La cadena α del Fc γ RII humano y murino tiene una porción extracelular de aproximadamente 180 aminoácidos, contiene dos dominios parecidos a la inmunoglobulina, ambos conectados a una región transmembranal de 27 a 29 aminoácidos y una región citoplasmática con una longitud variable de 44 a 76 aminoácidos (Fig 3, estructura de los Fc γ R)

Se ha reportado la estructura cristalográfica de los receptores Fc γ RIIA (Maxwell KF et al 1999), Fc γ RIIB (Sondermann et al 1999) y la estructura de

isoformas solubles de Fc γ RIIA y Fc γ RIIB expresadas en células de insectos (Sondermann et al 1999b).

En el Fc γ RIIA, la asociación de dominios muestra características únicas. El ángulo entre los dominios es de 52° y comparando la estructura del Fc γ RIIA con otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas, se observa que es uno de los miembros más plegados de ésta diversa familia de proteínas (Hulett & Hogarth 1994, Maxwell et al 1999).

La interacción del Fc γ RIIA con IgG2 es diferente que con IgG1, como se observa por la sensibilidad a mutaciones en loops del Fc γ RIIA donde hay cinco posibles residuos que afectan la unión de IgG2, mientras que existe un solo residuo sensible para la unión de IgG1 (Hulett et al 1995, Hulett et al 1994).

En cristales, las moléculas del Fc γ RIIA forman dímeros, creando una superficie de unión al ligando de 630 Å², similar a aquella de un antígeno con el complejo Fab (Chothia & Janin 1975), mientras que la superficie de unión del monómero es de apenas 230 Å², significativamente más pequeña que la interacción típica proteína-proteína. Parece que el dímero se presenta paralelo a la membrana celular, para ser fácilmente accesible para la IgG.

Ya que existe una amplia identidad en aminoácidos (97%) para el dominio extracelular de varias de las isoformas del Fc γ RII, es probable que la naturaleza de las interacciones de la molécula de IgG con el Fc γ RIIb1, b2 y Fc γ RIIc sean semejantes a las descritas para el Fc γ RIIA. La superficie de unión predicha y la interfase de los dímeros es idéntica en estos receptores. Además, en células que co-expresan estos diferentes receptores, se pueden formar heterodímeros

cuando los agrega la partícula opsonizada, aumentando la diversidad funcional de los FcRs.

La estructura del FcγRIIB soluble humano expresado en *E. coli.* fue resuelta por reemplazo isomórfico múltiple (MIR) a 1.7 Å de resolución. Se encontró una estructura en cristales tetragonales esencialmente idéntica al FcγRIIA expresado en células de insecto. La flexibilidad del extremo carboxi-terminal de la región que une el núcleo estructurado de la molécula con la parte transmembranal puede ser funcionalmente relevante permitiendo alguna reorientación del receptor para aumentar el reconocimiento de la porción Fc en los complejos inmunes. Los dominios de inmunoglobulina encontrados en los miembros de la superfamilia Ig son caracterizados por una estructura de dos hojas β plegadas unidas entre sí mediante un puente disulfuro conservado, conectando las dos hojas opuestas. Este modelo no contempla la participación de oligosacáridos, ya que la proteína fue expresada en *E. coli.*, y en estudios estructurales, los sitios identificados de n-glicosilación se encuentran alejados del sitio de unión. Por otro lado, la deglicosilación de la IgG1 provoca un desorden y disposición cercana de los dos dominios CH2, evitando la adecuada unión al FcγRIIb (Mimura et al, 2001).

FcγRIII

El FcγRIII precipita como una gruesa banda con un peso molecular entre 50 y 80 kDa, debido a una extensa glicosilación. El FcγRIII está expresado en macrófagos, neutrófilos y células cebadas y es el único de los FcγRs encontrado en células NK (Natural Killer) (van de Winkel & Anderson 1991, Hulett &

Hogarth 1994). Como el receptor Fc γ RII, el Fc γ RIII es clasificado como un receptor de baja afinidad para IgG. Los fragmentos Fc de IgG se unen al Fc γ RIII con un valor de K_A de $1.7 \times 10^5 M^{-1}$ (Ghirlando et al 1995).

Se han identificados en humanos dos genes de cadenas α del Fc γ RIII: el Fc γ RIIIA y Fc γ RIIIB. Ambos codifican proteínas que contienen una porción extracelular de aproximadamente 190 aminoácidos con dos dominios semejantes a inmunoglobulinas (Ravetch & Perussia 1989). La diferencia más significativa entre el Fc γ RIIIA y el Fc γ RIIIB es que el Fc γ RIIIA codifica una proteína con una región transmembranal y un dominio citoplasmático de 25 aminoácidos, mientras que el Fc γ RIIIB codifica una proteína que es anclada a la membrana por una unión de glicosil fosfatidil inositol (Ravetch & Perussia 1989). El Fc γ RIIIA y el Fc γ RIIIB tienen diferente distribución celular, el Fc γ RIIIA se encuentra en macrófagos, células NK y células cebadas, mientras que el Fc γ RIIIB es expresado principalmente en neutrófilos (van de Winkel & Anderson 1991, Hulett & Hogarth 1994).

A diferencia del sistema humano, se ha reportado una sola isoforma murina del Fc γ RIII expresada en macrófagos y células natural killer, consiste en dos dominios extracelulares semejantes a la inmunoglobulina y una región transmembranal (Ravetch et al 1986).

La cadena α del Fc γ RIII murino se asocia a la cadena γ (Kurosaki & Ravetch 1989), mientras que la cadena α del Fc γ RIIIA humano se asocia ya sea con γ (Hibbs et al 1989), o con la cadena ζ (en células natural killer) (Anderson

P et al 1990, Lanier et al 1989). Las cadenas γ y ζ protegen a la cadena α de la degradación en el retículo endoplásmico, por lo que la ausencia de las cadenas γ o ζ asociadas resulta en una reducción en la expresión de la superficie celular del Fc γ RIII transmembranal (Kurosaki & Ravetch 1989, Ra et al 1989).

Recientemente se ha descrito la estructura cristalográfica del Fc γ RIII a 3.5 Å de resolución (Radaev et al, 2001), en la que se observan cambios mínimos tanto en el receptor como en el anticuerpo, después de la formación del complejo. La comparación de secuencias de los residuos de interfase entre receptor y su ligando sugieren un modo de unión conservado y común a los miembros de la familia de F γ Rs. También se resalta la importancia de un sitio de glicosilación en la posición Asn²⁹⁷, en la porción Fc del anticuerpo, que aunque no parece estar en contacto directo con el receptor puede estabilizar la conformación de unión al receptor.

ITAM (Motivo de Activación basado en Tirosina de Inmunoreceptores)

Los receptores Fc capaces de desencadenar la activación de la célula, poseen dentro de su secuencia citoplasmática, uno o varios motivos de activación, ya sea en la misma cadena α del receptor, como en el caso del Fc γ RIIIa y del Fc γ RIIIc, o en alguna cadena asociada como las cadenas γ o ζ . Reth (1989) fue el primero en detectar motivos consenso en las partes citoplasmáticas de algunas cadenas de varios receptores involucrados en el reconocimiento antigénico, como los receptores de antígeno de Linfocitos T, Linfocitos B, y los receptores Fc γ .

Estos motivos, compuestos por dos secuencias YxxL separadas por siete residuos variables (la secuencia es: D/E-X(2)-Y-X(2)-L/I-X(7)-Y-X(2)-L/I), son ahora designados como ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) (Cambier et al 1994).

Los residuos de tirosina son esenciales en la transducción de señales a través de estos receptores, ya que después de la agregación se induce la fosforilación de estos residuos y sirven de punto de anclaje para cinasas de tirosina de las familias Src y Syk/Zap70, las cuales al unirse a los ITAMs fosforilados, aumentan su actividad catalítica fosforilando a su vez distintos sustratos celulares como la PLC- γ , fosfatidil inositol 3-cinasa, etc. En la figura 3 se muestran en recuadro los ITAMs del Fc γ RIIa, Fc γ RIIc, y de las cadenas γ y ζ .

Los receptores Fc con ITAM pueden ser de dos tipos: 1) Receptores multicadena compuestos por una subunidad α que se une al ligando, asociada con una o dos subunidades de transducción de señales en cuyo dominio intracitoplasmático se encuentra localizado el ITAM; estos representan la mayoría de los FcR. 2) Receptores de una cadena, en cuyo dominio intracitoplasmático se encuentra la secuencia ITAM, como es el caso de los receptores Fc γ RIIa y Fc γ RIIc. Estos receptores poseen un solo ITAM con doce residuos (en lugar de 7) entre las dos secuencias YxxL (Reth 1989).

Numerosos estudios han demostrado que la fosforilación en los residuos de tirosinas de los motivos ITAM es esencial para la transducción de señales a través de estos receptores, como fue detallado por Ortega (1995). La importancia de estos motivos queda demostrada por las siguientes

observaciones: a) la delección de los motivos ITAM, anula completamente la capacidad de los receptores para inducir funciones efectoras; b) receptores quiméricos conteniendo los dominios extracelulares de diversos receptores, unidos a la porción citoplasmática de cadenas γ o ζ con motivos ITAM intactos, son capaces de inducir respuestas bioquímicas idénticas a las inducidas por receptores intactos; c) la mutación dirigida de las tirosinas de los motivos ITAM por fenilalanina, anula la capacidad de los receptores para mediar funciones efectoras; d) el tratamiento de células que expresan receptores Fc γ R con inhibidores de cinasas de tirosina, elimina la fosforilación de las cadenas conteniendo ITAMs, así como la activación de la célula.

Se ha demostrado que en receptores que contienen ITAMs, como los receptores Fc γ RI, Fc γ RIIA y el Fc γ RIIIA, la agregación induce la activación de cinasas de tirosina de la familia Src, así como la cinasa p72Syk (Kiener et al 1993, Wang 1994, Liao et al 1992, Ghazizadeh et al 1994, Cone et al 1993, Darby et al 1994).

ITIM (Motivo de Inhibición basado en Tirosina)

Se ha identificado una secuencia YXXL en la porción intracitoplasmática del Fc γ RIIB, que se fosforila y recluta enzimas que contienen dominios SH2 para regular la fosforilación en tirosina; y que está altamente conservada tanto en humano como ratón. Por similitud en estructura y función con los motivos ITAMs, se decidió denominar a este motivo consenso ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) (D'Ambrosio et al 1995). Las células que son activadas después de la agregación de receptores que contienen ITAMs, pueden

ser reguladas negativamente por otros receptores que contienen este motivo consenso ITIM. Originalmente, este motivo fue identificado como una secuencia de 13 aminoácidos (AENTITYSLLKHP) en el dominio citoplasmático del μ Fc γ RIIB1, donde se observó que era necesario y suficiente para la inhibición de la activación de células B (Amigorena et al 1992) y que el residuo de tirosina es indispensable para la inhibición dependiente del Fc γ RIIB. Después de la coagregación con receptores que contienen ITAMs, el residuo de tirosina es fosforilado, y el Fc γ RIIB se convierte en un ligando potencial de moléculas con dominios SH2 (Muta et al 1994). Se encontró que péptidos sintéticos fosforilados correspondientes a la secuencia de 13 aminoácidos inhibitoria se unen *in vitro* a los dominios SH2 de algunas fosfatasa como la proteína tirosina fosfatasa SHP-1 (D'Ambrosio et al 1995), SHP-2 (Olcese et al 1996) y a la inositol 5-fosfatasa SHIP (Ono et al 1996, Fong et al 1996). En contraste, *in vivo*, estas fosfatasas muestran un diferente reclutamiento: SHP-1, SHP-2 y SHIP son reclutadas por Fc γ RIIB en células B (D'Ambrosio et al 1995, Olcese et al 1996), mientras que SHIP solo fue reclutada en células cebadas (Ono et al 1996, Fong et al 1996).

El descubrimiento de receptores inhibitorios de la citotoxicidad (KIRs), en células NK, que contienen ITIMs, ayudó a entender del mecanismo que controla la activación de estas células. El principal mecanismo que regula la función citotóxica de células NK es iniciado por el reconocimiento de moléculas clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) expresado por las células blanco (Yokoyama 1995, Moretta et al 1996).

Los KIRs transducen una señal negativa que lleva a la inhibición de la citotoxicidad tanto natural como de la dependiente de anticuerpo (ADCC) (Renard et al 1997); pertenecen a dos distintas superfamilias de proteínas: la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF), en las que se incluye a los KIRs humanos, p58, p70 y p140; y la superfamilia de lectinas tipo C, la cual incluye al KIR heterodímero humano CD94-NKG2A/B y al KIR murino (Ly-49) (Raulet & Held 1995, Lazetic et al 1996). Los KIRs también son expresados en células T y pueden inhibir la activación desencadenada vía el complejo TCR/CD3 (Fry et al 1996).

Los KIRs de humano y ratón representan una familia de al menos 11 miembros (Döhning et al 1996), contienen el mismo motivo consenso de inhibición que el FcγRIIB, confirmando la estructura YXXL. Además, tienen otro sitio conservado: un residuo de isoleucina o valina que se encuentra dos residuos N-terminal al residuo de tirosina conservado. Así se propuso la estructura del ITIM como: I/VxYxxL/V (Vivier & Daeron 1997).

La molécula gp49B1 es expresada principalmente en la superficie de células cebadas y no se conoce ligando extracelular (Katz et al 1996). Se considera un co-receptor que contiene ITIM ya que: 1) al igual que los KIRs pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas con una alta homología en sus dominios extracelular, transmembranal y citoplasmático; 2) gp49B1 contiene en su dominio citoplasmático dos motivos YXXL precedidos por una isoleucina y una valina respectivamente en la posición -2; 3) la coagregación de gp49B1 con el FcεRI en células cebadas derivadas de médula ósea inhibe la

activación; 4) gp49B1 es expresada no solo por células del linaje de células cebadas/basófilos sino también por células NK murinas.

Funciones de los FcγR:

FcγRI:

Como se mencionó al describir su estructura, el FcγRI, contiene un dominio extra semejante a la inmunoglobulina en su porción extracelular, en comparación con los receptores de baja afinidad FcγRII y FcγRIII. Debido a que los primeros dos dominios extracelulares del FcγRI comparten una gran similitud en secuencia con los dos dominios extracelulares de FcγRII y FcγRIII, se piensa que el tercer dominio es responsable de algunas de las interacciones que le confieren una unión de alta afinidad al FcγRI (Allen & Seed, 1989). Esto puede, en parte, ser demostrado con mutantes o proteínas quiméricas del FcγRI, donde se elimina o modifica este tercer dominio, esto abate la alta afinidad de éste receptor; esta alta afinidad no se restablece aún cuando se combinan el dominio 1 con el 3 (Hulett et al 1991). Por tanto, existen regiones del FcγRI además del tercer dominio que son necesarias para la unión de alta afinidad de la IgG monomérica (Hulett & Hogarth 1994).

El FcγRI puede mediar ADCC (Citotoxicidad Celular mediada por Anticuerpos), endocitosis y fagocitosis *in vitro* (Shen et al 1987, Anderson CL et al 1990, Davis et al 1995). A pesar de la capacidad del FcγRI para unir IgG monomérica con alta afinidad, la señales para endocitosis, degradación y fagocitosis, son transducidas por los FcγRI solo después del entrecruzamiento

de los receptores (Davis et al 1995). Aunque la asociación del Fc γ RI con IgG monomérica lleva a la internalización, los complejos receptor-IgG son rápidamente reciclados a la superficie de la célula (Harrison et al 1994). En cambio, cuando se tienen complejos multivalentes de antígeno con varias moléculas de anticuerpo, se da un entrecruzamiento de los receptores en la superficie de la célula, lo que provoca la internalización de los complejos, pero en lugar de ser reciclados, los complejos receptor-ligandos son retenidos en compartimentos intracelulares y subsecuentemente degradados (Mellman & Plutner 1984, Harrison et al 1994). La internalización y degradación de los complejos entrecruzados Fc γ RI-IgG-antígeno pueden llevar al aumento de la presentación de péptidos del antígeno en moléculas MHC clase II (Amigorena et al 1992).

Fc γ RII:

Las proteínas del Fc γ RII ejemplifican como agregados de IgG pueden desencadenar distintas respuestas biológicas, debidas básicamente a diferencias en el dominio citoplasmático de receptores que contienen dominios extracelulares de unión al ligando semejantes (Ravetch 1994).

Los Fc γ RIIa y Fc γ RIIc humanos son los únicos receptores Fc de una sola cadena en cuya porción citoplasmática contienen ITAMs. Se ha sugerido que en algunas células, el Fc γ RIIa puede asociarse con la cadena γ del Fc γ RIII, aunque esta evidencia es controversial (Masuda & Roor 1993). Los receptores Fc γ RIIa y Fc γ RIIc son codificados por dos genes relacionados, ambos localizados en el cromosoma 1. Los dos genes derivan de la duplicación del gene que codifica al

FcγRIIB (este receptor no expresa al ITAM, pero usa un exón adicional (Qiu et al 1990) que codifica para el ITIM).

Los receptores FcγRIIa y FcγRIIb difieren en su región extracelular en solo el 7% de los residuos de aminoácidos. No obstante, ambas formas pueden ser distinguibles por su unión característica a las subclases de IgG de humano y ratón (van de Winkel & Capel 1993) y sus diferentes afinidades por IgGs humanas (Sondermann et al 1999). La situación se vuelve más complicada por el polimorfismo de alto respondedor/bajo respondedor (HR/LR) del FcγRIIA, llamado así por la capacidad de células T de algunos individuos para responder a IgG1 murina induciendo mitogénesis. Más tarde, se encontró que dos intercambios en la secuencia de aminoácidos entre la forma LR y HR modifica la capacidad de unir IgG2 humana, lo que lleva a pensar que alguno de ellos está involucrado en la unión de IgG (Hogarth et al 1992).

Estudios tanto *in vivo* como *in vitro* muestran que el FcγRIIb actúa como un regulador negativo en la activación desencadenada por complejos inmunes (Muta et al 1994, Daeron 1995, Takai et al 1996). En linfocitos B, el entrecruzamiento del FcγRIIb1 y la Ig de membrana por complejos de antígeno y anticuerpos solubles, modula la activación de células B (Amigorena et al 1992a, Muta et al 1994) proporcionando un mecanismo de retroalimentación para la regulación de la estimulación de células B a concentraciones altas de anticuerpo soluble. Estudios *in vitro* muestran la posible participación del FcγRIIb1 con el FcεRI inhibiendo su activación (Daeron 1995) a través de la secuencia consenso de inhibición denominada ITIM.

Fc γ RIII:

Estudios con células NK (Asesinas Naturales) de ratones deficientes de la cadena γ no son capaces de mediar ADCC, al parecer por la ausencia del Fc γ RIII en la superficie de la célula (Takai et al 1994).

Además de su papel en ADCC, se ha demostrado por experimentos *in vitro* que el Fc γ RIII participa de manera importante en endocitosis y fagocitosis (van de Winkel & Anderson 1991, Amigorena et al 1992b, Daeron et al 1994, Nagarajan et al 1995). El Fc γ RIIIA murino media la rápida internalización de complejos antígeno-anticuerpo y aumenta la eficiencia de la presentación de antígeno. Las tirosinas del motivo ITAM de la subunidad γ son requeridas para la señalización que desencadena la internalización y fagocitosis de eritrocitos cubiertos con anticuerpos.

Experimentos de transfección con células de ovario de Hamster chino (CHO) demostraron que el Fc γ RIIIa, al co-expresarse con la cadena γ , mediaba fagocitosis de eritrocitos cubiertos con IgG (Nagarajan et al 1995). En cambio, células CHO expresando solo el Fc γ RIIIb eran capaces de unir eritrocitos opsonizados, pero no eran capaces de mediar fagocitosis, lo que sugiere que el Fc γ RIIIb unido al lípido no desencadena por sí mismo la señal de fagocitosis en células CHO (Nagarajan et al 1995). Sin embargo, otros reportes sugieren que el Fc γ RIIIb puede actuar sinérgicamente con el Fc γ RII para aumentar algunas respuestas como la fagocitosis (Edberg et al 1992, Edberg & Kimberly 1994).

MECANISMOS DE ENDOCITOSIS:

Los Fc γ R son capaces de mediar endocitosis, esto es, la internalización de receptores unidos a complejos inmunes de IgG, mediante dos procesos distintos, pinocitosis y fagocitosis (Silverstein et al 1977, Silverstein et al 1989).

Pinocitosis y Fagocitosis:

La pinocitosis y la fagocitosis son biológicamente distinguibles por el tamaño de la partícula que va a ser endocitada, la temperatura a la cual el proceso es interrumpido, y la participación del citoesqueleto en la formación de filamentos de actina. La pinocitosis involucra la unión de pequeños complejos inmunes ($\leq 1 \mu\text{m}$) a hoyos (pits) cubiertos con clatrina, la internalización de estos pits cubiertos para formar vesículas no se detiene por efecto de la citocalasina D, que evita la polimerización de actina. El progreso del proceso a temperaturas cerca de los 17°C es casi normal, aún cuando a esta temperatura la fusión del endosoma-lisosoma es detenida.

La fagocitosis, por otro lado, involucra la internalización de partículas grandes cubiertas de anticuerpos ($\geq 1 \mu\text{m}$) por un proceso que involucra al citoesqueleto y puede ser interrumpido por citocalasina D; el proceso es detenido a temperaturas por debajo de los 17°C. La clatrina parece no estar involucrada en la fagocitosis.

Fagocitosis:

La fagocitosis es el proceso de reconocimiento y englobamiento de microorganismos o desechos tisulares que se acumulan en sitios de infección e inflamación. Esta función, esencial para la defensa del huésped, es realizada

más eficientemente por leucocitos denominados "fagocitos profesionales". Estos incluyen neutrófilos, monocitos y macrófagos. Estas células fagocíticas tienen en su superficie receptores que reconocen estructuras características de varios patógenos o células anormales pero ausentes en células de individuos sanos. También expresan receptores para opsoninas: inmunoglobulinas y fragmentos de complemento que se unen a la superficie del patógeno.

La fagocitosis inicia cuando una partícula se une a receptores específicos en la membrana celular, dentro de los receptores capaces de mediar fagocitosis están las tres clases de receptores Fc γ , los cuales permiten a los fagocitos reconocer e ingerir microorganismos y otras partículas cubiertas con IgG.

Después de la unión de la partícula al fagocito, la partícula es englobada (Figura 4). Se pueden observar proyecciones elevándose de la superficie de la célula en la región donde la partícula es tocada y pseudópodos formando una estructura como de taza rodeando la partícula, los pseudópodos avanzan hasta alcanzar un solo punto donde la membrana se fusiona. La región que se requiere para la fusión membranal es muy pequeña, no mayor que en la pinocitosis. Después de que la estructura se ha cerrado, la partícula se encuentra en una vesícula, el fagosoma, el cual empieza a moverse de la superficie al interior de la célula. El fagosoma es rodeado por lo que solía ser la membrana plasmática y ahora está totalmente ocupado por la partícula ingerida con muy poco fluido entre la partícula y la membrana.

El mecanismo de englobamiento más aceptado es el modelo de zipper (cierre) propuesto por Silverstein (Griffin et al 1975). Este modelo establece que

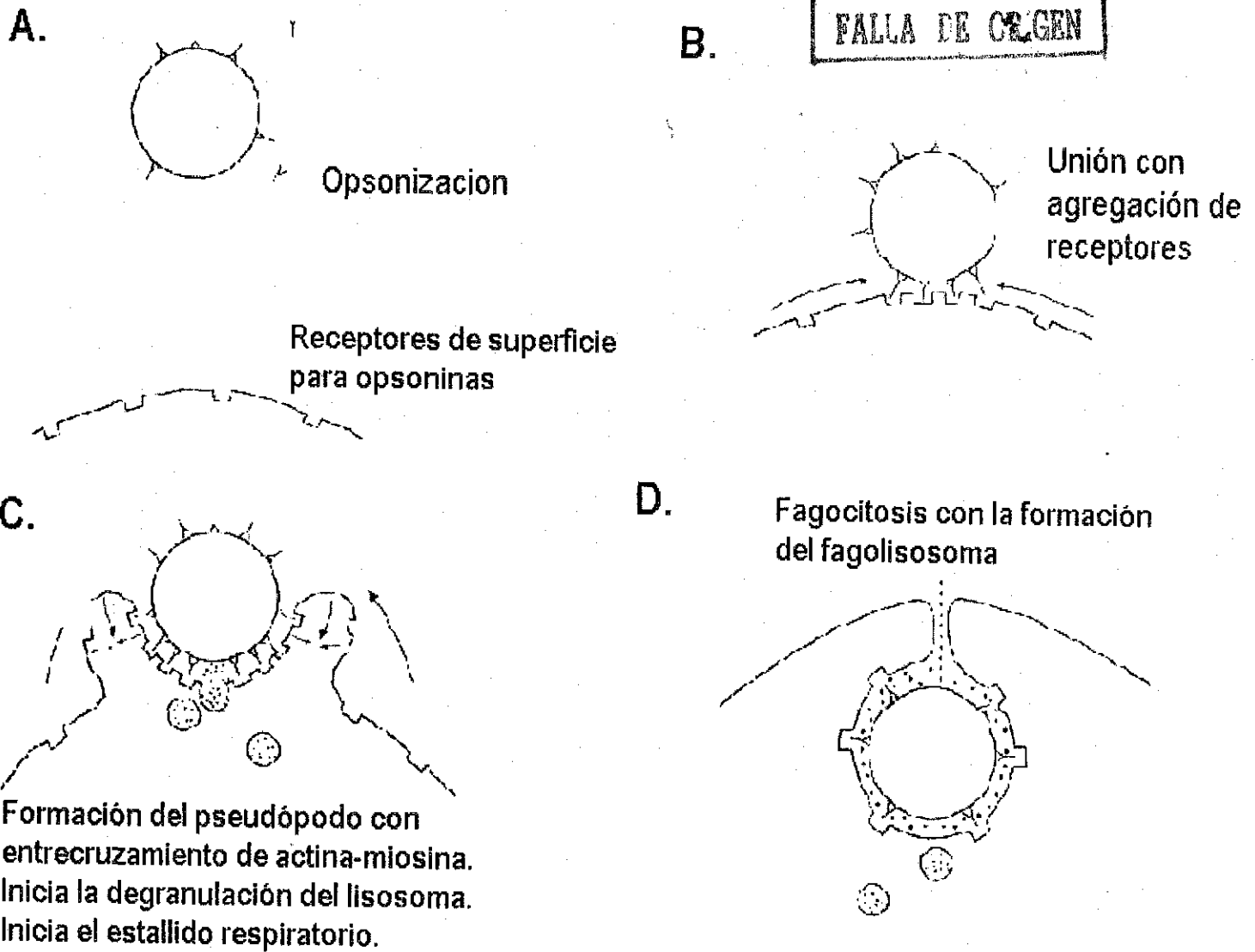


Figura 4. Los cuatro pasos de la fagocitosis. Reconocimiento inicial del blanco fagocítico, cubierto con anticuerpos, en el panel A. La interacción inicial lleva a una serie de cambios coordinados en la membrana del fagocito y en el citoesqueleto, el cual lleva a la extensión de pseudópodos alrededor del blanco (panel B). El inicio del englobamiento está acompañado por una serie de cambios en la composición de la membrana plasmática y del poco fluido en el sitio de la ingestión, lo que lleva a la degranulación y secreción regulada (panel C). Finalmente, la membrana plasmática del fagocito se fusiona, llevando a la internalización del blanco fagocítico con la membrana del fagocito en el fagosoma (panel D) (Paul, 1999).

la fagocitosis requiere repetidas interacciones con el ligando en la partícula blanco y los receptores en la célula fagocítica, y que la interrupción en la formación de nuevas interacciones en cualquier punto evita la ingestión de la partícula (Griffin et al, 1976). En este modelo, la célula fagocítica se mueve

sobre la partícula blanco como un cierre. Los microfilamentos de actina polimerizan y se organizan al final del cierre, la actina en la base está menos organizada. La evidencia a favor incluye observaciones de microscopía electrónica de fagocitos en el proceso de ingestión de partículas cubiertas con IgG, uso de anticuerpos anti-receptor y remoción de opsoninas de una porción del blanco fagocítico por agregación (capping) (Griffin et al 1975).

El proceso de fagocitosis mediado a través de los receptores Fc γ es diferente al mediado por complemento; la extensión de pseudópodos no es aparente en la fagocitosis mediada por complemento (Kaplan et al, 1977), así como su sensibilidad a citocalasina D y colchicina, lo que sugiere que la ingestión mediada por IgG es más dependiente de los microfilamentos de actina que la internalización mediada por complemento, y que la fagocitosis mediada por complemento es más sensible a los inhibidores de microtúbulos.

Cascada de Señalización en Fagocitosis:

Se ha demostrado que Fc γ RI, Fc γ RIIa y Fc γ RIIIa son capaces de mediar fagocitosis. Después de la agregación de los receptores, los ITAMs de las cadenas γ asociadas al Fc γ RI y Fc γ RIIIa, o de la cadena α del Fc γ RIIa, son fosforilados (Indik et al, 1995) (Figura 5). Se reclutan cinasas de tirosina de las familias Src y Syk/Zap70 después de la fosforilación. La activación de Syk es necesaria para la fagocitosis (Matsuda et al 1996), después de la agregación induce la ingestión y la polimerización de actina (Greenberg et al, 1996), lo que sugiere que este es un paso crítico para iniciar la fagocitosis mediada por los Fc γ R. Aunque todavía no se conocen todos los componentes de la cascada de

fagocitosis, se sabe que la fosfatidilinositol (PI) 3 cinasa participa en la ingestión mediada por FcγR (Ninomiya et al, 1994), esta enzima puede ser activada por cinasas de tirosina y es capaz de regular la forma y la extensión (spreading) de la célula por efecto sobre las integrinas y la polimerización de actina (Shimizu et al, 1995; Hotchin & Hall, 1996).

La fosfolipasa Cγ (PLCγ) es activada por el entrecruzamiento de los FcγR como un efecto posterior a la activación de Syk (Shen et al, 1994). Esto lleva a la generación tanto de IP₃ como de diacilglicerol, con la consecuente liberación de calcio intracelular almacenado al citoplasma, el cual activa varias isoformas de PKC. La actividad de la PKC se requiere para fagocitosis (Zheleznyak et al, 1992 y Allen et al, 1995). PKCα rápidamente se asocia con el fagosoma naciente y permanece asociada hasta su maduración. El principal sustrato de la PKC en macrófagos, es el sustrato de cinasa C rica en alanina miristoilada (MARKS) y las MacMARKS, parecen estar involucradas en la regulación del ensamblaje de actina durante la formación del fagosoma (Aderem 1995).

La importancia del aumento de la concentración intracitoplasmática de iones Ca²⁺ por la activación de PLCγ en fagocitosis es controversial. Algunos estudios reportan que a bajas concentraciones de Ca²⁺ hay una fagocitosis normal, otros reportan inhibición bajo las mismas condiciones (Edberg et al, 1995, Lew 1985). Cuando solo los FcγR están involucrados en la fagocitosis, un aumento de Ca²⁺ no es importante. Sin embargo, cuando los fagocitos son estimulados al máximo de su capacidad potencial en sitios de inflamación (Gresham et al, 1991), un incremento en calcio parece ser necesario para

estimular la máxima ingestión. Se sabe que la concentración de calcio puede regular la activación de PKC, la interacción de la actina con varias proteínas de unión, y procesos dependientes de calmodulina, incluyendo la interacción con miosina (Collins et al, 1990), cualquiera de estos procesos puede ser requerido de manera distinta para la ingestión basal o estimulada.

La fosfolipasa D (PLD) rompe fosfolípidos, especialmente fosfatidilcolina, produciendo ácido fosfatídico y colina. La cascada de cinasas de tirosina y receptores de siete pasos transmembranales pueden sinergizar para aumentar la actividad de PLD, lo que sugiere un mecanismo por el cual múltiples señales en el sitio de inflamación, incluyendo adhesión, quimocinas, complemento y péptidos bacterianos, regulan el fenotipo de los fagocitos que migran a este sitio. Aunque no se sabe como influye la actividad de PLD en la fagocitosis, es posible que el ácido fosfatídico generado por la PLD pueda proporcionar una fuente alternativa de diacilglicerol para la activación de PKC.

La fosfolipasa A2 (PLA2) rompe ácidos grasos en la posición R2 de varios fosfolípidos. Experimentos farmacológicos sugieren que una isoforma específica de PLA2 tiene un importante papel en la fagocitosis (Lennartz et al, 1991), esta isoforma es distinta a la responsable de proporcionar el araquidonato para la actividad de la ciclooxigenasa. La PLA2 fagocítica es independiente de calcio y prefiere fosfatidilserina como sustrato, es activada por PKC (Lennartz et al, 1993). Esta PLA2 aparentemente está involucrada en la fusión endosoma-lisosoma y por tanto es un candidato para mediar la fusión membranal final que permite la formación del fagosoma y su liberación de la membrana

plasmática y también puede jugar un papel en la fusión de vesículas con un fagosoma naciente (Mayorga et al, 1993).

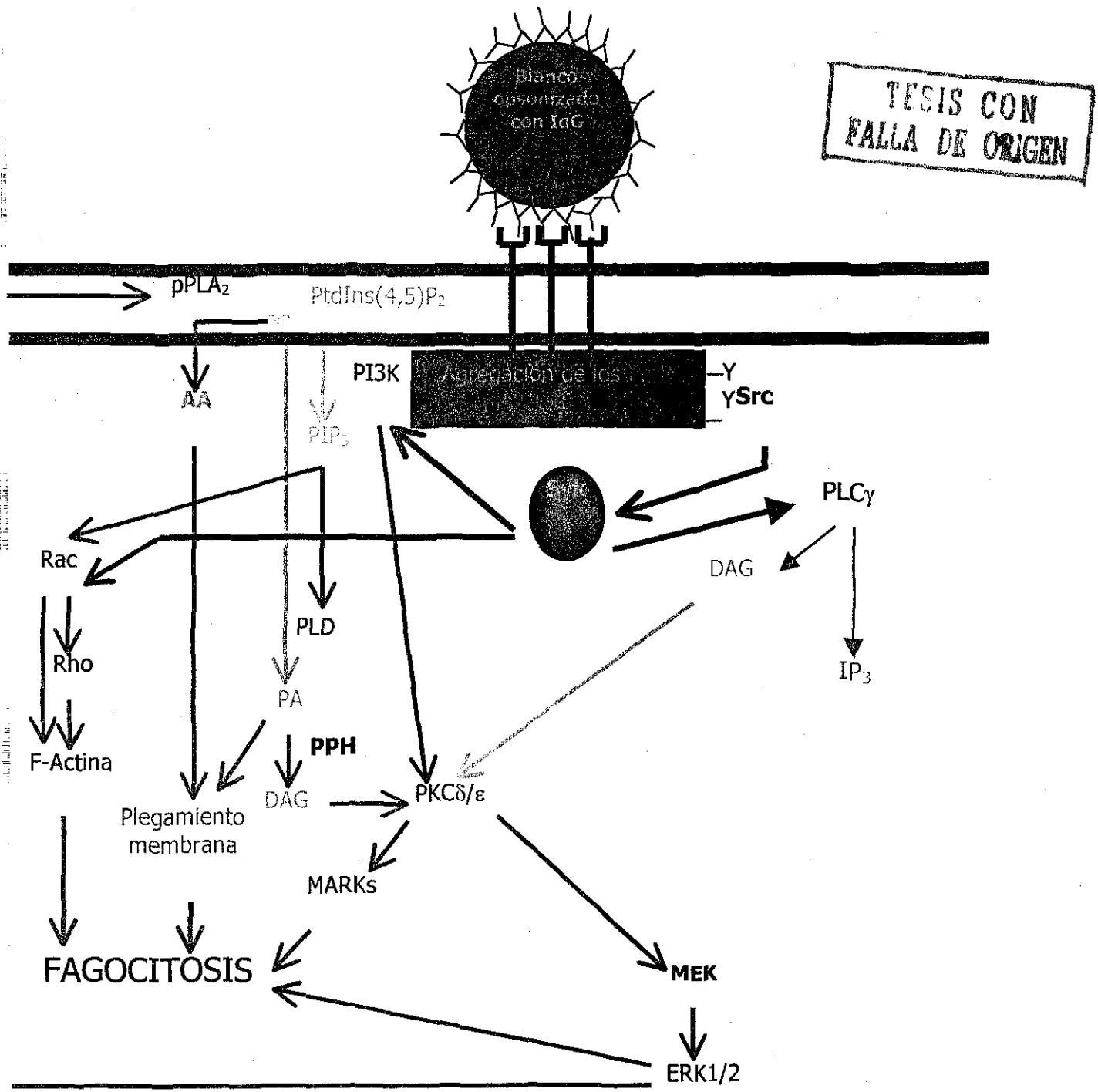


Figura 5. Transducción de señales de fagocitosis vía FcγR. Después del entrecruzamiento de los receptores por antígenos multivalentes se inicia la cascada de señalización, donde participan numerosas enzimas para desencadenar la Fagocitosis (Santoyo Paula, 2002).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA (JUSTIFICACIÓN)

Una función esencial de los anticuerpos es su capacidad de unión al antígeno. Gracias a la formación de los complejos antígeno-anticuerpo se puede dar la neutralización de agentes infecciosos. Sin embargo, otra propiedad de suma importancia es la capacidad de la inmunoglobulina para reaccionar con otras moléculas fuera de su sitio de combinación con el antígeno, lo que puede desencadenar funciones efectoras tanto por células como por el sistema del complemento.

El estudio de la activación de las células hematopoyéticas a través de los receptores para anticuerpos, se ha dilucidado principalmente a través del uso de anticuerpos monoclonales dirigidos en contra de la porción extracelular de los receptores, así como de moléculas asociadas. Esto ha sido de gran importancia, ya que así se han identificado varios componentes que participan en la transducción de señales a través de estos receptores. Sin embargo, estos estudios no permiten explorar la influencia de características intrínsecas de la molécula de inmunoglobulina presente en los complejos antígeno-anticuerpo.

Las distintas subclases de IgG, que son el ligando natural de los receptores Fc γ , tienen una alta homología en su secuencia de aminoácidos; las principales diferencias entre las subclases se localizan en la región de la bisagra, que es la región que le confiere flexibilidad a la molécula. También en esta región se han identificado sitios de unión a los receptores Fc γ , aunque el o los sitios exactos todavía son controversiales.

Al comparar, mediante estudios de depolarización de fluorescencia en nanosegundos, la flexibilidad de las distintas subclases de anticuerpos murinos, se ha descrito que la IgG1 presenta una región de la bisagra menos flexible, mientras que las subclases IgG2a e IgG2b, presentan una mayor flexibilidad.

Las diferencias reportadas en la secuencia de las distintas subclases, pueden afectar la flexibilidad y por tanto ser importantes en la conformación que puede adoptar la molécula de inmunoglobulina. Una molécula de anticuerpo que presente mayor flexibilidad, puede adoptar un rango más amplio de conformaciones diferentes, hasta encontrar una que al entrecruzar los receptores Fc γ desencadene una función efectora más eficiente. Esto se ha demostrado en la fijación de complemento y en el fenómeno de ADCC (Oi VT et al, 1984, Roux K et al 1997) donde a mayor flexibilidad de la inmunoglobulina, se observa una mayor eficiencia para fijar complemento.

Tomando en cuenta que, los pequeños cambios que presentan en su secuencia las diferentes subclases de anticuerpos, pueden tener repercusiones importantes en la activación de funciones efectoras como la fijación de complemento y ADCC, decidimos investigar si las distintas subclases de IgG, presentan diferencias en su capacidad para mediar fagocitosis, que es otra función efectora importante que realiza el macrófago, a través de receptores Fc γ .

HIPÓTESIS

Las distintas subclases de IgG, pueden mostrar diferente eficiencia para mediar la fagocitosis a través de los receptores Fc γ presentes en macrófagos murinos.

OBJETIVOS

Determinar la capacidad de distintas subclases de IgG para mediar a través de los receptores Fc γ , la fagocitosis de eritrocitos de carnero por macrófagos murinos.

HIPÓTESIS

Las distintas subclases de IgG, pueden mostrar diferente eficiencia para mediar la fagocitosis a través de los receptores Fc γ presentes en macrófagos murinos.

OBJETIVOS

Determinar la capacidad de distintas subclases de IgG para mediar a través de los receptores Fc γ , la fagocitosis de eritrocitos de carnero por macrófagos murinos.

MATERIALES Y METODOS

REACTIVOS:

Para el cultivo de las líneas celulares empleadas, se utilizaron medios de cultivo D-MEM (Medio Esencial Modificado por Dulbecco) y RPMI-1640, así como suplementos tales como suero fetal bovino, aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio. Para determinar la viabilidad de las células se utilizó azul tripano. Todos estos reactivos fueron de la marca GIBCO, Grand Island.

Glutamina, antibióticos como penicilina y estreptomicina, Ovoalbúmina, Albúmina Sérica Bovina, 2,4-dinitrofenol (DNP), kit para tipificación del isotipo de anticuerpos, Cloramina T, p-nitrofenil fosfato de sodio, dietanolamina, Sefarosa 4B, 3,3'-diaminobencidina, Sephadex G25, Dithiothreitol (DTT), Etilendiaminotetracetato Disódico (EDTA), azida de sodio (NaN_3), iodoacetamida, Dimetilsulfóxido (DMSO), y la papaína inmovilizada se obtuvieron de SIGMA Chemical Co.

Los reactivos Ácido 2,4-dinitrobencensulfónico (DNBS) y Ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico (TNBS), fueron obtenidos de Eastman KODAK Co.

Los anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón conjugados con la enzima fosfatasa alcalina utilizados fueron de ZYMED. Se utilizó el isótopo radioactivo ^{125}I obtenido de NEN (New England Nuclear). La herbimicina se obtuvo de Calbiochem. El m-bisulfito de sodio, el ácido trifluoroacético (TCA), y el yoduro de potasio (KI) se obtuvieron de Merck.

Los antígenos OVA/DNP₂₆ (Ovoalbúmina acoplado a 26 moléculas de DNP) y BSA/DNP₁₉ (Albúmina Sérica Bovina acoplada a 19 moléculas de DNP)

se prepararon según la técnica descrita por Eisen (1964). Los eritrocitos de carnero fueron obtenidos en ERIKAR y mantenidos en refrigeración en Alsevers.

Líneas Celulares:

Se utilizaron dos líneas celulares de macrófagos murinos: J774 y P388D1, que fueron obtenidas del ATCC (American Type Culture Collection); estas células fueron mantenidas en cultivo en nuestro laboratorio en medios D-MEM y RPMI-1640, respectivamente, suplementados en ambos casos con 10% de suero fetal bovino inactivado (30 min, 56°C), glutamina 2 mM, antibióticos a una concentración final de: 10 µg/ml estreptomina y 100 unidades/ml de penicilina G; 100 µM de aminoácidos no esenciales y 1 mM de piruvato de sodio. Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C.

Por ser los macrófagos células adherentes, fue necesario despegar las células para subcultivarlos o bien, para sembrar en placas para los experimentos de fagocitosis y formación de rosetas. Para esto se utilizó una solución de EDTA 10mM en PBS o en medio sin complementar, incubando esta solución con los macrófagos de 5 a 10 minutos a 37° C. Se decantó el sobrenadante y se dieron golpes suaves para que las células se desprendieran de la superficie adherida y así obtener la suspensión de células aisladas.

Los hibridomas productores de anticuerpos anti-DNP, así como el hibridoma 2.4G2 fueron mantenidos en medio D-MEM suplementado.

Producción de Hibridomas:

Los anticuerpos monoclonales anti-DNP utilizados en este trabajo fueron producidos previamente por nosotros siguiendo el método descrito por Galfrè y Milstein en 1981 (Garay C, 1994). Brevemente, varios ratones de la cepa Balb/C fueron inmunizados subcutáneamente con 10 μ g de antígeno OVA/DNP₂₆ (DNP acoplado a Ovoalbúmina) por animal, con adyuvante completo o incompleto de Freund, de 6 a 8 veces con intervalos de dos semanas entre inmunizaciones. Seis semanas después de la última inyección, se inmunizó por vía intraperitoneal con antígeno pero sin adyuvante, tres y cuatro días previos a la fusión.

Las células de bazo de un ratón inmunizado fueron fusionadas con células de mieloma SP2/O en una relación de 5:1, utilizando como agente fusionante PEG 1550 al 41% en medio DMEM libre de suero, complementado solo con antibióticos y glutamina.

Aproximadamente dos semanas después de la fusión los sobrenadantes de los hibridomas que mostraron crecimiento fueron probados mediante un ensayo estandarizado de ELISA para identificar aquellas clonas productoras de anticuerpos que se unieran eficientemente al DNP y que cumplieran con la condición de pertenecer a alguna subclase de IgG. Este ensayo se realizó en microplacas de 96 pozos (COSTAR) utilizando como antígeno BSA/TNP. Después de bloquear la placa con BSA al 1% en PBS se agregaron 100 μ l del sobrenadante de cada hibridoma y se incubó por 2 hrs a 37°C. Después de los lavados se determinó el pegado usando un anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón

acoplado a fosfatasa alcalina y se reveló con p-nitrofenilfosfato disódico en buffer de dietanolamina. La densidad óptica de las placas fue leída espectrofotométricamente a 405 nm en un lector de ELISA (BIO-RAD).

Aquellas clonas en cuyos sobrenadantes, se detectó la presencia de anticuerpos anti-DNP, fueron posteriormente tipificadas en cuanto a la subclase del anticuerpo que secretan. Las clonas productoras de anticuerpos de las distintas subclases de IgG fueron seleccionadas y clonadas por dilución limitante. De esta forma se seleccionaron siete hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-DNP. Su nomenclatura se basa en la posición de la clona dentro de la placa original después de la fusión; igualmente se nombró a los anticuerpos que producen. A continuación se mencionan los anticuerpos que secretan estos hibridomas junto con la subclases a la que pertenecen: AcMo (anticuerpos monoclonales) 2C5, 2C8 y 3E9 pertenecen a la subclase IgG1; los AcMo 2C3 y 3G10 a la subclase IgG2a; y los AcMo 3B5 y 4F8 pertenecientes a la subclase IgG2b.

Estos anticuerpos fueron purificados a partir de líquido de ascitis obtenido de ratones de la cepa Balb/C inoculados en la cavidad peritoneal con los diferentes hibridomas. Los anticuerpos monoclonales se purificaron por cromatografía de afinidad en una columna de Sefarosa-BSA-DNP.

Sensibilización de Eritrocitos de Carnero:

Los glóbulos rojos de carnero fueron obtenidos comercialmente (ERIKAR) y mantenidos en refrigeración en solución de Alsevers. Antes de utilizarse se lavaron tres veces por centrifugación a 2000 RPM durante 15 minutos, en una

solución de DGVB²⁺ (apéndice I) y una vez en buffer de boratos (0.2 M, NaCl 0.15, pH=8.5)

Los eritrocitos se sensibilizaron con 6.22 mg de TNBS (ácido trinitrobencensulfónico) en 7 ml de buffer de boratos por cada ml de botón de eritrocitos. Se incubaron 10 minutos en agitación constante, a temperatura ambiente y cubiertos de la luz. Al cabo de este tiempo se hicieron cuatro lavados, el primero en buffer de boratos y los tres posteriores en solución de DGVB²⁺. Los eritrocitos sensibilizados así preparados pueden conservarse hasta una semana en refrigeración, cubiertos de la luz.

NOTA:

Para utilizar estos eritrocitos en ensayo de fagocitosis, fue necesario, lavar previamente los eritrocitos tres veces en medio de cultivo sin complementar.

Hemaglutinación:

Se realizó en placas de 96 pozos con fondo en "V". Se hicieron diluciones seriadas del anticuerpo de interés en medio sin complementar y posteriormente se agregó un volumen igual al de la dilución del anticuerpo, de una solución de eritrocitos al 2% en medio de cultivo sin complementar. Se incubó durante dos horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda para evitar evaporación. El título de hemaglutinación se consideró como la última dilución a la cual se observa la malla de hemaglutinación en el fondo del pozo.

Opsonización de Eritrocitos:

Una vez que se ha obtenido el título de hemaglutinación, se preparó una solución de eritrocitos al 1 % en medio de cultivo sin complementar, y se agregó la cantidad de anticuerpo que corresponde a la dilución del título de hemaglutinación, si se necesitaba una opsonización de eritrocitos a concentración aglutinante, aunque esta concentración podía variar de acuerdo al ensayo. Se incubaron los eritrocitos con el anticuerpo, con agitación suave y cubiertos de la luz, por 30 minutos a temperatura ambiente.

También se utilizaron los eritrocitos de la placa de hemaglutinación si es que se requería probar diferentes concentraciones de un mismo anticuerpo.

Ensayo de Formación de Rosetas:

Para estos ensayos se utilizaron macrófagos murinos de la línea celular J774 y P388D1. Se sembraron 50,000 células por pozo en placas de 96 pozos con fondo plano en 100 μ l de medio de cultivo suplementado. Las células se dejaron adherir a la placa toda la noche a 37° C con 5% de CO₂. Sobre las células se agregaron 10 μ l/pozo de la solución de eritrocitos opsonizados. Se incubaron durante una hora a 4° C (en baño de hielo). Después de la incubación, se lavó cuatro veces sumergiendo la placa en una solución de PBS, agitando por espacio de 20 segundos. Se eliminó todo el sobrenadante por decantación solo hasta el último lavado.

Determinación microscópica:

Después del último lavado, se observaron las células en un microscopio invertido (Zeiss) a un aumento de 200x. Se contaron 100 macrófagos totales en diferentes campos y se consideraron células positivas para rosetas, aquellos macrófagos que después de los lavados se observaran con al menos ocho eritrocitos unidos a la periferia del macrófago.

Determinación por ensayo colorimétrico:

Después de los lavados las células se lisaron con 100 μ l/pozo de una solución de SDS al 0.3% en PBS, para liberar la hemoglobina de los eritrocitos adheridos a la superficie del macrófago. Aprovechando la propiedad de la hemoglobina para actuar como pseudoperoxidasa se agregaron 200 μ l por pozo de la solución de revelado: 4 mg de DAB (3,3'-diaminobencidina) y 20 μ l de H₂O₂ en 10 ml de PBS. Se dejaron incubar unos minutos a temperatura ambiente con agitación constante hasta la aparición de color. Se determinó la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Bio-Rad 3550).

Ensayo de Fagocitosis:

En paralelo a los ensayos de formación de rosetas, se llevaron a cabo ensayos de fagocitosis por los macrófagos murinos de las líneas celulares J774 y P388D1. Se sembraron 50,000 células por pozo, en placas de 96 pozos con fondo plano en 100 μ l de medio de cultivo complementado. Las células se dejaron adherir a la placa toda la noche a 37° C con 5% de CO₂. Sobre las células se agregaron 25 μ l de la solución de eritrocitos opsonizados por pozo.

Se incubaron de 30 a 45 minutos las células J774 y de 60 a 90 minutos las células P388D1, a 37° C con 5% de CO₂. Después de la incubación, la placa se sumergió primero en agua desionizada durante 10 segundos para lisar los eritrocitos que no fueron ingeridos; posteriormente se lavó tres veces más, sumergiendo la placa en una solución de PBS, agitando por espacio de 20 segundos para desechar cualquier resto de hemoglobina. Se eliminó todo el sobrenadante por decantación solo hasta el último lavado.

Determinación microscópica:

Se observaron las células después del último lavado en el microscopio invertido (Zeiss) a un aumento de 200x. Se contaron 100 macrófagos totales en diferentes campos y se consideraron células positivas para fagocitosis aquellos macrófagos que hubieran ingerido al menos ocho eritrocitos.

Determinación colorimétrica:

Después de lisar los eritrocitos no ingeridos y eliminar los restos celulares y la hemoglobina de éstos, se lisaron las células con 100 µl/pozo de una solución de SDS al 0.3% en PBS para liberar la hemoglobina de los eritrocitos que fueron ingeridos por los macrófagos. Aprovechando la propiedad de la hemoglobina de actuar como pseudoperoxidasa se agregaron 200 µl/pozo de la solución de revelado: 4 mg de DAB (3,3'-diaminobencidina) y H₂O₂ en PBS. Se dejaron incubar unos minutos a temperatura ambiente con agitación constante hasta la aparición de color. Se determinó la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Bio-Rad 3550).

Iodinación de Anticuerpos:

Se seleccionó un anticuerpo monoclonal purificado de cada subclase: 2C5 (IgG1), 2C3 (IgG2a) y 3B5 (IgG2b). Estos anticuerpos fueron marcados radioactivamente con ^{125}I , mediante el método de cloramina T descrito por Hunter & Greenwood (1962). Se usaron 500 μCi de ^{125}I por cada 500 μg de proteína en presencia de 500 μg de cloramina T preparada recientemente, se mezcló perfectamente y después de unos segundos se agregaron 500 μg de m-bisulfito de sodio. Inmediatamente después, se separó la proteína marcada del ^{125}I libre en una columna de Sephadex G25 previamente bloqueada con BSA 1% en PBS, monitoreando la separación con la ayuda de un detector de radioactividad.

Para medir la cantidad de incorporación del ^{125}I a la proteína se utilizó el método de precipitación con TCA en fase líquida, combinando 500 μl de la solución A (2.5 mg de BSA, 1.66 mg de KI en 10 ml de PBS) con 500 μl de la solución B (TCA al 10% en PBS) y 1.0 μl de muestra. Las muestras se trabajaron por triplicado dejando incubar las muestras toda la noche a 4° C. Después se centrifugó y se guardó 500 μl del sobrenadante (S) por separado del volumen remanente del tubo (R). Para calcular :

$$\% \text{TCA pp} = \frac{R-S}{R+S} \times 100$$

La concentración del anticuerpo se determina midiendo su densidad óptica en un espectrofotómetro a 280 nm, usando la relación:

$$1.4 \text{ D.O.} = 1 \text{ mg/ml.}$$

Ensayos de Inhibición de la Fagocitosis y Rosetas:

Con anticuerpo anti Fc γ RII y Fc γ RIII

Para estos ensayos se utilizó el anticuerpo monoclonal de rata 2.4G2, el cual reconoce epítopes de la porción extracelular de los receptores Fc γ RII y Fc γ RIII murinos. Este anticuerpo se obtuvo comercialmente como hibridoma del ATCC, y se mantuvo en cultivo a 37°C con 5% de CO₂ en medio D-MEM suplementado. A partir del sobrenadante de cultivo se purificó el anticuerpo por cromatografía de afinidad en una columna de proteína G-Sefarosa. Para los ensayos de inhibición se preincubaron los macrófagos por espacio de una hora a 4°C con diferentes concentraciones del anticuerpo 2.4G2 y posteriormente se agregaron los eritrocitos opsonizados.

Para asegurarnos que la inhibición era debida al reconocimiento del anticuerpo en su porción Fab, se probó el anticuerpo completo y los fragmentos Fab. Los fragmentos Fab se obtuvieron por digestión del anticuerpo 2.4G2 con papaína inmobilizada.

El anticuerpo purificado se concentró en conos AMICON™ por centrifugación, y se cambió el buffer en el que se encuentra por buffer de digestión (2 mM de EDTA, 1 mM DTT en PBS, pH=7). Por otro lado, se preactivó la papaína inmobilizada incubándola en buffer de digestión por 30 minutos a 37°C. Se mezclaron el anticuerpo con la papaína inmobilizada en una proporción masa:masa de 1:60 (papaína:anticuerpo) y se dejaron incubar durante 6 horas a 37° C con agitación constante. Se paró la reacción con una solución 2 mM de iodoacetamida y se centrifugó la mezcla nuevamente en el

cono de AMICON™ agregando PBS para cambiar el buffer en el que se encontraba el anticuerpo.

El anticuerpo digerido se purificó incubándolo toda la noche a 4°C con proteína G Sefarosa. Los fragmentos Fab no se unen a la Proteína G, y por tanto permanecen en el sobrenadante, mientras que los fragmentos Fc y el anticuerpo sin digerir, permanecen unidos al adsorbente. Después de separar el sobrenadante, los fragmentos Fc y el anticuerpo no digerido se eluyeron con glicina 0.1 M pH=2.5. Para evaluar la digestión del anticuerpo, se analizaron las fracciones obtenidas en geles reductores de poliacrilamida al 12 %, donde por el peso molecular se podía distinguir los diferentes fragmentos del anticuerpo. Tanto el anticuerpo completo, como los distintos fragmentos obtenidos se usaron para inhibir la formación de rosetas como se describió anteriormente.

Reducción y Alquilación de Anticuerpos:

Para tratar de explicar las diferencias observadas en cuanto a la eficiencia para mediar fagocitosis, se trató de modificar la flexibilidad de los anticuerpos dada por la región de la bisagra, que es la porción en donde se encuentra una distinta secuencia entre anticuerpos de diferente subclase de IgG y es también en esta región donde las subclases difieren en el número de puentes disulfuro entre las dos cadenas pesadas. Para lograr este objetivo, se redujeron y alquilaron los diferentes anticuerpos, utilizando DTT para reducir los puentes disulfuro y iodoacetamida para alquilarlos. Se estandarizó este método de reducción y alquilación probando diferentes tiempos de reacción.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Después de este procedimiento los anticuerpos fueron dializados contra PBS para eliminar el DTT y la iodoacetamida que se agregaron en exceso.

Estas muestras se analizaron en geles de poliacrilamida al 12% para evaluar la eficiencia de la reducción y alquilación. Los anticuerpos fueron utilizados en los ensayos de Rosetas y Fagocitosis antes descritos.

Inhibición de Fagocitosis por Inhibidores de Cinasas de Tirosina:

Como inhibidor específico de cinasas de tirosina se utilizó la herbimicina en concentraciones de 1, 2 y 5 μM de un stock de 500 μM en DMSO (concentración final de DMSO <2%).

Las células fueron incubadas con las diferentes concentraciones de herbimicina en 100 μl de medio complementado durante 16 hrs a 37° C con 5% de CO₂. Posteriormente, se realizó el ensayo de fagocitosis como anteriormente se describió.

Se determinó la viabilidad de las células después del tratamiento con herbimicina, agregando 10 μl de azul tripano al 0.4% directamente en pozos controles que fueron incubados con las diferentes concentraciones de herbimicina así como del vehículo, en este caso el DMSO. Solo se realizaron experimentos cuando la viabilidad fuese mayor al 90%.

RESULTADOS

El objetivo de este trabajo fue determinar si las diferentes subclases de IgG murina muestran diferencias en su eficiencia para mediar fagocitosis a través de receptores Fc para IgG en macrófagos murinos.

La mayoría de los estudios de activación a través de los receptores Fc γ se realizan con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la porción extracelular de estos receptores, logrando la activación eficiente al entrecruzar los anticuerpos anti-receptor con anticuerpos anti-inmunoglobulinas. Esta estrategia descarta la interacción del ligando natural (la porción Fc del anticuerpo) con su receptor. También se han realizado estudios utilizando IgG de conejo, la cual aunque ha probado ser eficiente para activar estos receptores, no es ligando natural del receptor.

El ligando natural de los receptores Fc γ , la IgG, se encuentra representada por distintas subclases, que difieren en pequeños cambios en la secuencia de aminoácidos en sitios que pueden ser estratégicos, como la región de la bisagra; estas diferencias confieren a los anticuerpos propiedades que resultan ser importantes para determinar la activación del receptor de IgG como en el caso de la fijación de complemento y ADCC (Oi, 1984). Nuestro principal interés en este trabajo es estudiar si la subclase de IgG influye en la eficiencia de la activación, porque hay muy pocos estudios que examinen directamente esta cuestión. El entrecruzamiento de los receptores producido por las diferentes subclases podría ser distinto, posiblemente porque cada subclase presenta una mayor o menor movilidad dependiendo de su región de

la bisagra, lo que podría permitir a los receptores tener una mayor libertad para adoptar la conformación u orientación más adecuada y así poder producir una activación más o menos eficiente.

Para obtener los reactivos adecuados para este estudio, se produjeron hibridomas que secretaran anticuerpos IgG anti-DNP. De los anticuerpos monoclonales obtenidos, se seleccionaron anticuerpos que pertenecieran a las diferentes subclases de IgG y presentaran afinidades equivalente por el antígeno como fue determinado por apagamiento de fluorescencia y descrito detalladamente en la tesis de licenciatura "Producción y Caracterización de anticuerpos monoclonales murinos de la clase IgG, específicos para el 2,4-dinitrofenol" (Garay, 1994) y cuyas afinidades se muestran en la Tabla II.

Los anticuerpos seleccionados fueron: de la subclase IgG1 los anticuerpos 2C5, 2C8 y 3E9; de la subclase IgG2a los anticuerpos 2C3 y 3G10; y de la subclase IgG2b los anticuerpos 3B5 y 4F8. Estos anticuerpos fueron purificados por cromatografía de afinidad a partir de líquido de ascitis obtenido de ratones Balb/C inoculados con el hibridoma.

Como sistema experimental para estudiar la capacidad de las distintas subclases para mediar la activación de macrófagos a través de los receptores Fc γ , se utilizaron ensayos de fagocitosis de eritrocitos de carnero por macrófagos murinos de las líneas celulares J774 y P388D1. Estos macrófagos expresan los tres tipos de receptores Fc γ . Para comprobar la unión de los eritrocitos opsonizados con las distintas subclases, se cuantificó previamente la formación de rosetas.

Tabla II. Determinación de la afinidad de anticuerpos monoclonales por el método de apagamiento de fluorescencia.

Anticuerpo	Subclase	Afinidad
2C5	IgG1	7.95×10^5
2C8	IgG1	2.76×10^5
3E9	IgG1	5.09×10^5
2C3	IgG2a	1.72×10^5
3G10	IgG2a	6.04×10^5
3B5	IgG2b	7.49×10^5
4F8	IgG2b	7.38×10^5

Rosetas de Eritrocitos de Carnero Oponizados con las Distintas Subclases de Anticuerpos Monoclonales Anti-DNP:

Como primer paso se determinó la formación de rosetas entre macrófagos de la línea celular J774 y eritrocitos de carnero sensibilizados con DNP y oponizados con cada uno de los anticuerpos. La formación de rosetas se evaluó microscópicamente, considerando positivas a las células con al menos ocho eritrocitos unidos, de un total de 100 macrófagos contados. Como control positivo se utilizaron eritrocitos de carnero oponizados con anticuerpos purificados de sueros policlonales obtenidos de conejos inmunizados con DNP-OVA. Los resultados se muestran en la parte superior de la figura 6 (A).

Como se puede observar en la figura 6 (A), se detectó un porcentaje de formación de rosetas superior al 80% de las células para los eritrocitos oponizados con las distintas subclases de anticuerpos, así como para los eritrocitos oponizados con anticuerpos de conejo. No se observan diferencias

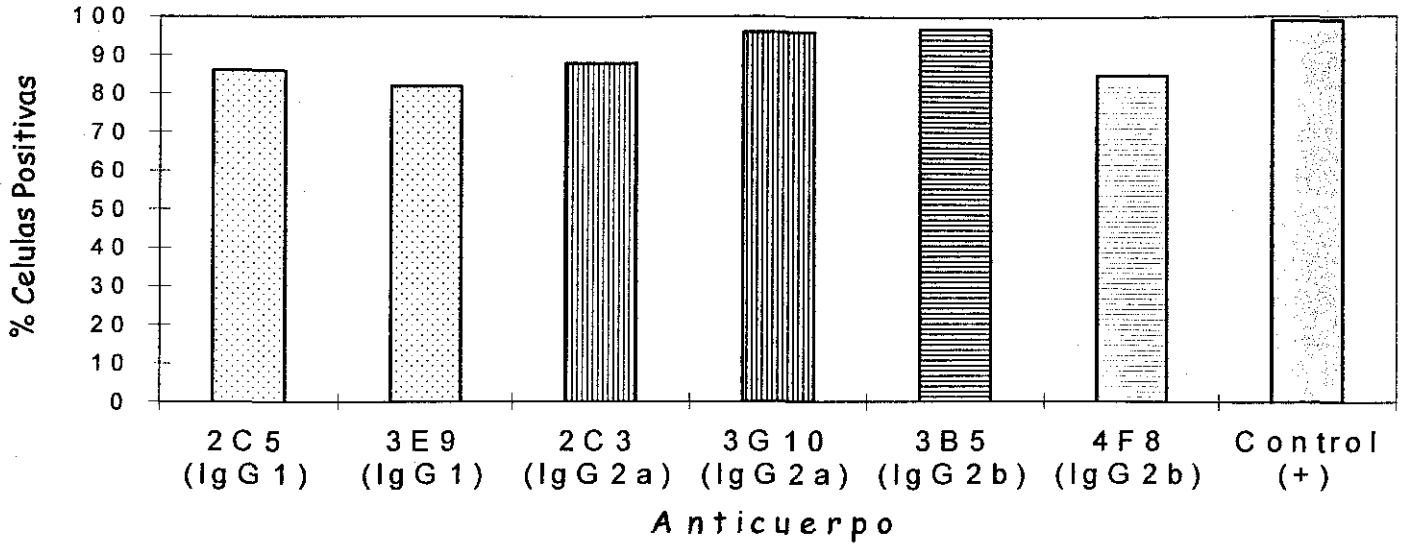
significativas entre los distintos anticuerpos en cuanto a su capacidad para mediar la formación de rosetas. Esto nos indica que los eritrocitos de carnero opsonizados se unen a los macrófagos de una forma similar. En seguida, se midió la capacidad de estos macrófagos para fagocitar a estos eritrocitos.

Fagocitosis de Eritrocitos de Carnero Opsonizados con las Distintas Subclases de Anticuerpos Monoclonales Anti-DNP:

También determinamos la fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados con cada una de las subclases de IgG, evaluándose microscópicamente. Se consideraron como positivas, aquellas células que fagocitaron al menos ocho eritrocitos, contando 100 macrófagos totales en distintos campos. Al igual que para la formación de rosetas se utilizó como control positivo IgG policlonal anti-DNP de sueros de conejo.

Los resultados se muestran en la parte inferior de la figura 6 (B), donde se puede observar que los eritrocitos opsonizados con las distintas subclases mediaron fagocitosis. Entre el 60 y 80% de las células fagocitan eficientemente los eritrocitos opsonizados con los anticuerpos de las subclases IgG2a e IgG2b. Los eritrocitos opsonizados con el control positivo fueron ingeridos por casi el 100% de los macrófagos, mientras que se nota una menor eficiencia de los anticuerpos de la subclase IgG1 para mediar este proceso, ya que como se observa en la gráfica los eritrocitos opsonizados con estos anticuerpos apenas son fagocitados por alrededor del 20% de los macrófagos.

A. Rosetas J774



B. Fagocitosis J774

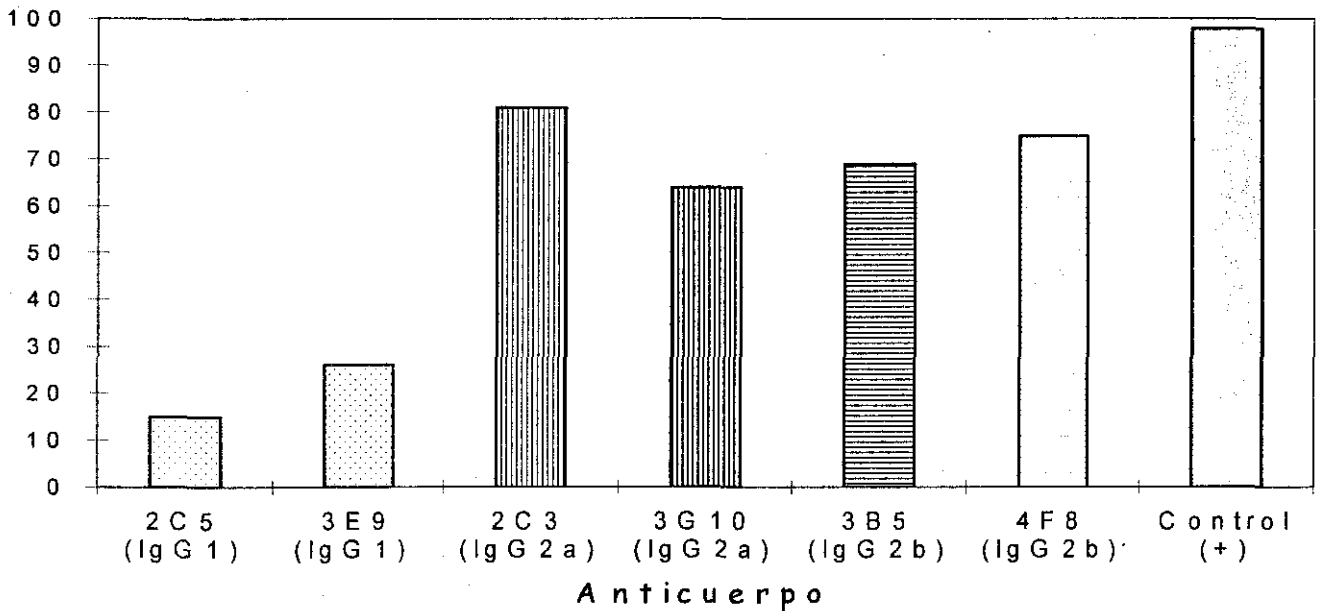
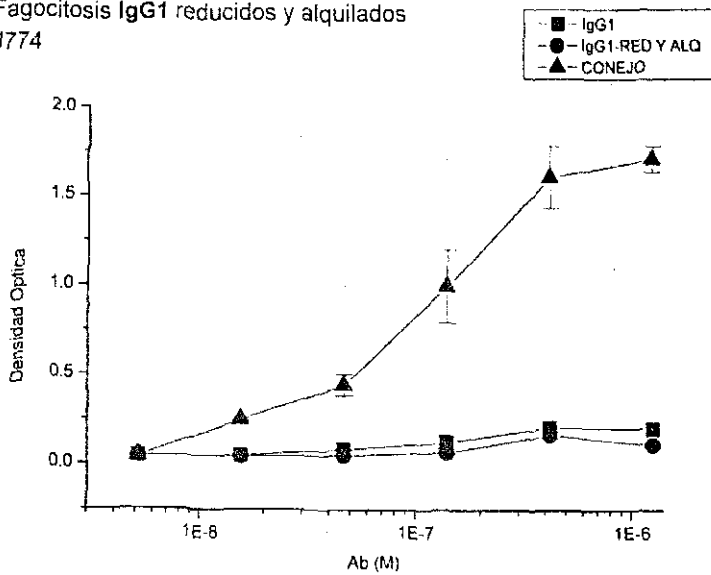
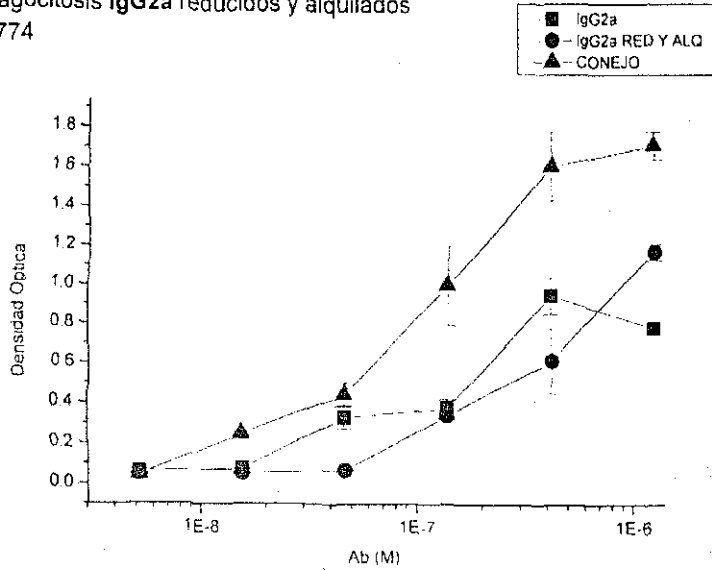


Figura 6. Determinación microscópica de rosetas y fagocitosis entre eritrocitos de carnero opsonizados con IgG y macrófagos murinos J774. Eritrocitos opsonizados con cada uno de los anticuerpos monoclonales a una concentración aglutinante fueron incubados 60 minutos con macrófagos J774 a 4°C (Rosetas) y a 37° C (Fagocitosis). (A) Se lavaron los eritrocitos no adheridos, o (B) se lisaron los eritrocitos no ingeridos; después se evaluó la formación de rosetas o fagocitosis en el microscopio invertido a un aumento de 200x. El control(+) son GRc opsonizados con IgG de suero policlonal de conejo anti-DNP. Los anticuerpos utilizados fueron: 2C5 y 3E9 (IgG1), 2C3 y 3G10 (IgG2a), 3B5 y 4F8 (IgG2b).

Fagocitosis IgG1 reducidos y alquilados
J774



Fagocitosis IgG2a reducidos y alquilados
J774



Fagocitosis IgG2b reducidos y alquilados
J774

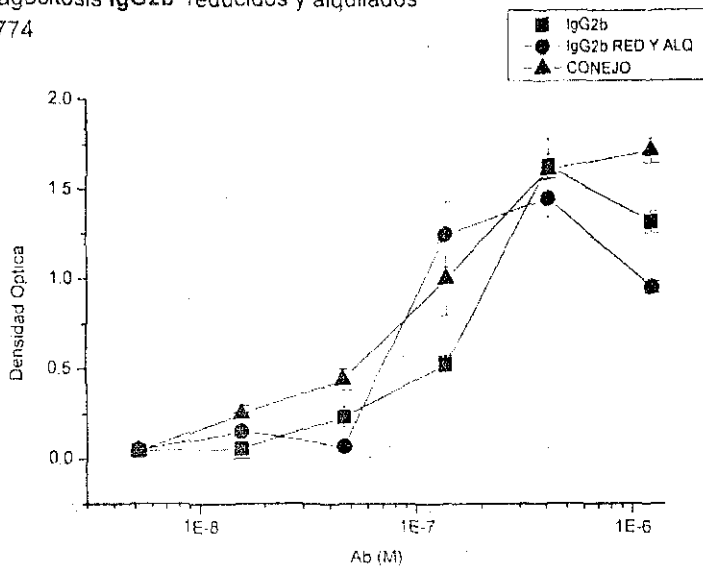


Figura 14. Fagocitosis de eritrocitos opsonizados con anticuerpos reducidos y alquilados. Macrófagos J774 fueron incubados durante 60 minutos a 37° C, con eritrocitos opsonizados con los anticuerpos monoclonales 2C5 (IgG1), 2C3 (IgG2a) y 3B5 (IgG2b) en forma nativa (cuadros sólidos) o después de ser reducidos y alquilados con DTT e iodoacetamida (círculos sólidos). La fagocitosis fue evaluada por el método colorimétrico y en triángulos sólidos se muestra la IgG de conejo (control positivo).

Inhibición de fagocitosis por herbimicina:

Para continuar los estudios de las diferencias para mediar fagocitosis entre distintas subclases de IgG, nos preguntamos si la fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados con las diferentes subclases de anticuerpos por macrófagos murinos era igualmente sensible al efecto de la Herbimicina, que es un potente inhibidor de cinasas de tirosina de la familia Src.

Para llevar a cabo la inhibición por herbimicina de la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con las distintas subclases, se estandarizaron las condiciones más apropiadas para los macrófagos murinos J774. Se encontró que con una incubación previa del inhibidor por 16 hrs a 37° C en incubadora de CO₂ con humedad controlada y usando concentraciones de herbimicina entre 0.1 a 6 µM, es posible obtener una curva de inhibición adecuada. A estas concentraciones, ni el vehículo ni la herbimicina afectan la viabilidad de las células, como se comprobó midiendo la viabilidad de las células con cada tratamiento mediante la incorporación de azul de tripano, encontrando que la viabilidad de las células es mayor al 90%.

Después de la incubación del inhibidor con los macrófagos por 16 horas, se agregaron los eritrocitos opsonizados con cada una de las subclases y se determinó la fagocitosis por el método colorimétrico.

Como se muestra en la figura 15, hay una clara inhibición por la herbimicina de la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con todos los anticuerpos probados. Llama la atención que a concentraciones de 1 a 2 µM de inhibidor, la fagocitosis de los eritrocitos opsonizados con IgG1 parece

aumentar en lugar de disminuir. Este efecto es reproducible ya que fue observado en al menos tres experimentos.

Inhibición de fagocitosis por herbimicina

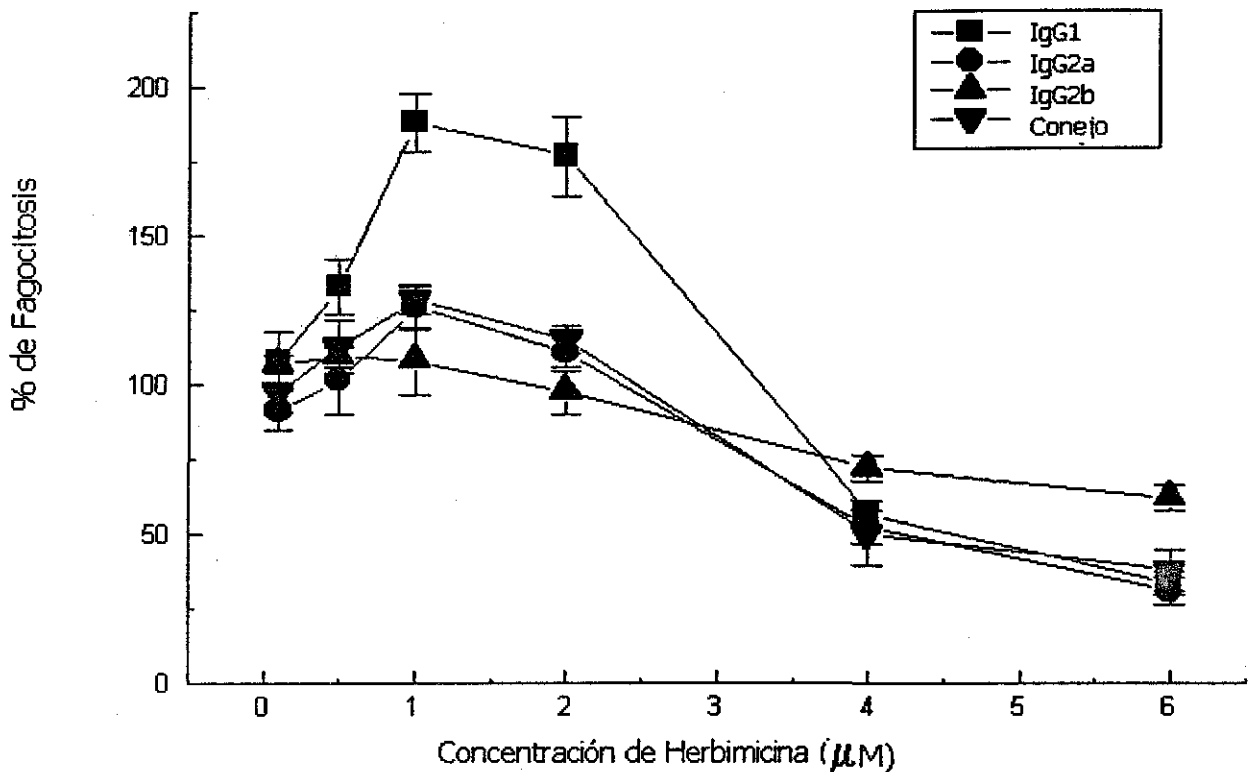


Figura 15. Inhibición de la fagocitosis por herbimicina. Macrófagos murinos J774 fueron incubados con concentraciones crecientes del inhibidor a 37° C por 16 hrs. Al cabo de este periodo, se agregaron eritrocitos opsonizados con un miembro de cada subclase. 2C5 (IgG1), 2C3 (IgG2a) y 3B5 (IgG2b). También se opsonizaron eritrocitos con IgG de suero policlonal de conejo anti-DNP (Control positivo). La fagocitosis se determinó por el método colorimétrico.

DISCUSIÓN

Existen varios receptores de membrana que participan en la activación de células por antígeno, tales como los receptores para antígeno en linfocitos T (TCR) y en linfocitos B (BCR) y los receptores para inmunoglobulinas IgE (FcεRI) e IgG (FcγR). Estos receptores comparten varias características estructurales y funcionales, por lo que se ha propuesto agruparlos en una familia de receptores multicadena de reconocimiento inmune (Multichain immune recognition receptors, MIRRs) (Keegan & Paul 1992). Funcionalmente, todos estos receptores participan en procesos de activación celular inducida por el antígeno y el mecanismo de activación de estos receptores es por agregación a diferencia de otros tipos de receptores como los de hormonas.

Una parte considerable de los estudios de activación por FcγRs se han realizado utilizando anticuerpos que reconocen la porción extracelular de la cadena α de los receptores, o bien, en contra de otras subunidades del receptor. Gracias a estos anticuerpos, han sido descritos los componentes de la cascada de señalización iniciada por estos receptores que lleva a una función efectora variada pero definida.

El interés de este trabajo, es estudiar la influencia que tiene el ligando natural, la IgG, permitiendo la unión a través de su fragmento Fc, en la activación a través de los FcγR y la subsecuente iniciación de la fagocitosis en macrófagos murinos.

Basándonos en los estudios que demuestran que las distintas subclases de anticuerpos tienen una secuencia de aminoácidos homóloga y conservada en

celular J774. La determinación microscópica nos proporciona información valiosa del número de eritrocitos que están cubriendo al macrófago, sin embargo, no permite el manejo de un gran número de muestras. En cambio el método colorimétrico nos proporciona de forma rápida y sencilla, el promedio de los eritrocitos que están rodeando al macrófago, como medida indirecta de la presencia de hemoglobulina que actúa como pseudoperoxidasa ante el sustrato adecuado.

Por ambos métodos se obtuvo una formación de rosetas superior al 80% para todas las subclases de anticuerpos (Figuras 6-10). Estos resultados nos indican que los eritrocitos opsonizados se están uniendo de forma similar a los macrófagos murinos, independientemente de la subclase de anticuerpo que lo esté cubriendo.

Al determinar la fagocitosis mediada a través de los receptores Fc γ , de los eritrocitos opsonizados con las distintas subclases, se observó que la eficiencia para mediar esta función varía dependiendo de la subclase de anticuerpo que cubre al eritrocito; así tenemos que la eficiencia para mediar fagocitosis determinada por microscopía o por el método colorimétrico es el siguiente: IgG2b \geq IgG2a \gg IgG1. Este efecto fue consistente al probar varios miembros de una misma subclase.

La diferencia para mediar fagocitosis por las distintas subclases es muy marcada, pero no se debe a una baja unión del eritrocito al macrófago, como se demuestra en los ensayos de formación de rosetas.

El efecto en la eficiencia para mediar la fagocitosis es consistente e independiente de la línea celular de macrófago que se utilice, ya que en este estudio se utilizaron también macrófagos murinos de las líneas celulares P388D1 y RAW, en las que se observaron las mismas diferencias que se observan con células J774, aunque para alcanzar niveles similares de fagocitosis, a los macrófagos P388D1 les toma cerca de 90 minutos y a las células RAW alrededor de 2 hrs, mientras que a los macrófagos J774 bastan 45 minutos.

Cuando se utilizan anticuerpos de la subclase IgG1 para opsonizar eritrocitos, se observa a diferencia de las otras suclases, que la fagocitosis es muy baja. Esto podía deberse a un pobre recubrimiento de los eritrocitos opsonizados con los anticuerpos de esta subclase; los anticuerpos podían encontrarse en un número mínimo suficiente para permitir la unión de las células, pero no suficiente para entrecruzar los receptores y por eso se observaba una muy baja fagocitosis mediada por estos anticuerpos.

Para despejar esta incógnita se decidió marcar radioactivamente anticuerpos de las distintas subclases con ^{125}I , para así determinar el número de moléculas de anticuerpo por eritrocito, después se realizaron los ensayos de fagocitosis con estos eritrocitos cubiertos con anticuerpos radioactivos determinando la fagocitosis por el método colorimétrico. Aquí se encontró que para eritrocitos opsonizados con un mismo número de moléculas de anticuerpo, se observaba el efecto dramáticamente distinto dependiendo de la

subclase de anticuerpo que cubre al eritrocito, mediando los anticuerpos de la subclase IgG1, una fagocitosis muy pobre.

Aunque se sabe que sólo el Fc γ RI es capaz de unir IgG monomérica, los datos acerca de la afinidad de cada receptor por las distintas subclases de IgG son contradictorios, y dependen básicamente del tipo de complejo antígeno-anticuerpo que se utilice para determinar esta unión. Por otro lado, se ha demostrado que cuando se expresan en células CHO cada tipo de receptor por separado, los tres tipos de receptores son capaces de mediar fagocitosis (Indik et al, 1995). En nuestro sistema, es imposible determinar con precisión cual o cuales tipos de receptores Fc γ median la fagocitosis, y sobretodo si los tipos de receptores que participan son distintos dependiendo de la subclase de IgG opsonizante. Como un acercamiento a esta cuestión, determinamos el efecto de bloquear los receptores Fc γ RII y Fc γ RIII, sobre la fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados con cada subclase de IgG.

Existe comercialmente un anticuerpo monoclonal que reconoce indistintamente un epítipo común en la porción extracelular de los receptores Fc γ RII y Fc γ RIII murinos (anticuerpo 2.4G2). Con este anticuerpo quisimos probar si la fagocitosis observada con todas las subclases de anticuerpos era mediada a través de los mismos receptores. Este objetivo se logró bloqueando los receptores Fc γ con el anticuerpo 2.4G2. Previamente a la fagocitosis se incubó el anticuerpo completo 2.4G2 sobre las células a 4° C, para permitir la unión del anticuerpo a los receptores. En estos ensayos se observó una inhibición total de la fagocitosis con todas las subclases de anticuerpos IgG

opsonizando los eritrocitos. Sin embargo, como se usó el anticuerpo 2.4G2 completo, se tenía que descartar la posibilidad de que el anticuerpo estuviera uniéndose y bloqueando también al receptor tipo I, a través de su Fc.

Se prepararon fragmentos Fab utilizando papaína inmovilizada. Una vez que se obtuvieron y purificaron los fragmentos Fab del anticuerpo 2.4G2, se realizaron nuevamente los ensayos de fagocitosis. De nuevo se observó una inhibición total de la fagocitosis para todas las subclases de anticuerpos; descartándose así que la inhibición observada fuese debida a la unión del Fc del anticuerpo 2.4G2.

Se ha descrito que la fagocitosis puede ser mediada a través de los receptores Fc γ RI, Fc γ RIIa y Fc γ RIIIa. De acuerdo a nuestros resultados el receptor tipo I parece no ser capaz de mediar la fagocitosis en ausencia de la participación del Fc γ RII y/o Fc γ RIII. También se ha reportado que cuando los receptores Fc γ RIIa y Fc γ RIIIa participan en el proceso de la fagocitosis pueden actuar sinérgicamente. Esto puede explicar el hecho de que al bloquear estos receptores con el anticuerpo 2.4G2 hayamos observado una inhibición total de la fagocitosis.

Los anticuerpos son glicoproteínas flexibles que pueden adoptar una amplia variedad de conformaciones como consecuencia de una movilidad de dominios y de una flexibilidad segmental (Wringle et al 1983, Dangl et al 1988). Esta movilidad contribuye a su doble función de reconocer y posteriormente eliminar partículas extrañas del cuerpo. Se ha descrito que la molécula de IgG1 murina es rígida mientras que las moléculas IgG2a e IgG2b

son más flexibles (Schneider et al 1988). Una manera de modificar esta flexibilidad es reduciendo y alquilando los puentes disulfuro de las inmunoglobulinas. Con estos anticuerpos modificados se realizaron ensayos de fagocitosis y rosetas, en los que no se observó un cambio significativo en la fagocitosis mediada por los anticuerpos modificados al compararse con la fagocitosis mediada por los anticuerpos sin modificar. Esto nos sugiere que los puentes disulfuro de la IgG1 no son los únicos responsables de la flexibilidad de la molécula. Schneider y colaboradores en un estudio de cinética de emisión anisotrópica revelaron que la flexibilidad segmental de los anticuerpos estaba controlada por el dominio CH1, así como por la región de la bisagra. Por el contrario, los dominios CH2 y CH3 no mostraron una influencia en la flexibilidad segmental. La bisagra y el dominio CH1 deben estar apropiadamente apareados para permitir una facilidad de movimiento de las unidades Fab y es en esta región donde se encuentran las mayores diferencias entre las subclases de anticuerpos. Las fuerzas de van der Waals también participan de manera importante en la estabilidad y movilidad de los anticuerpos y aunque los puentes disulfuro estén modificados en la molécula, estas fuerzas junto con puentes de hidrógeno y otras fuerzas, podrían colaborar para mantener la conformación y las características estructurales propias de cada subclase de anticuerpo.

De acuerdo a estos antecedentes y a los resultados obtenidos, cabe destacar por un lado el hecho de que el efecto observado en la eficiencia para mediar fagocitosis por las distintas subclases de anticuerpos opsonizantes,

parece reflejar una característica propia de la estructura de la subclase del anticuerpo, más que una particularidad de un anticuerpo, ya que se probaron más de un miembro de cada subclase, observándose un efecto similar. Por otro lado, la modificación de los puentes disulfuro parece no ser crucial para afectar características estructurales del anticuerpo, ya que se conservan los efectos observados en la fagocitosis al compararlos con los anticuerpos sin modificar.

Dentro del anticuerpo una región que podría ser responsable de las diferencias observadas, es la región de la bisagra, ya que parece ser muy importante en cuanto a estructura y conformación del anticuerpo, y es la región en la que las distintas subclases presentan una mayor diferencia. Aunque no se determinó la flexibilidad de cada subclase de anticuerpo, se sabe que la flexibilidad de la región de la bisagra le da libertad a la molécula de inmunoglobulina para adoptar una posición que al entrecruzar los receptores puede permitirle una adecuada orientación de manera que inicie eficientemente la cascada de transducción de señales (Figura 16).

Como un primer acercamiento para ver si se estaban formando los mismos complejos al iniciar la cascada de transducción de señales, se estudió la sensibilidad de la fagocitosis a la inhibición por un potente inhibidor de cinasas de tirosina, la herbimicina. Con este inhibidor se encontró una inhibición total de la fagocitosis mediada por las distintas subclases. Interesantemente, a bajas concentraciones del inhibidor (de 1-2 μM) se observa en los eritrocitos opsonizados con anticuerpos IgG1 que la herbimicina parece estar favoreciendo la activación de las células, ya que la fagocitosis aumenta.

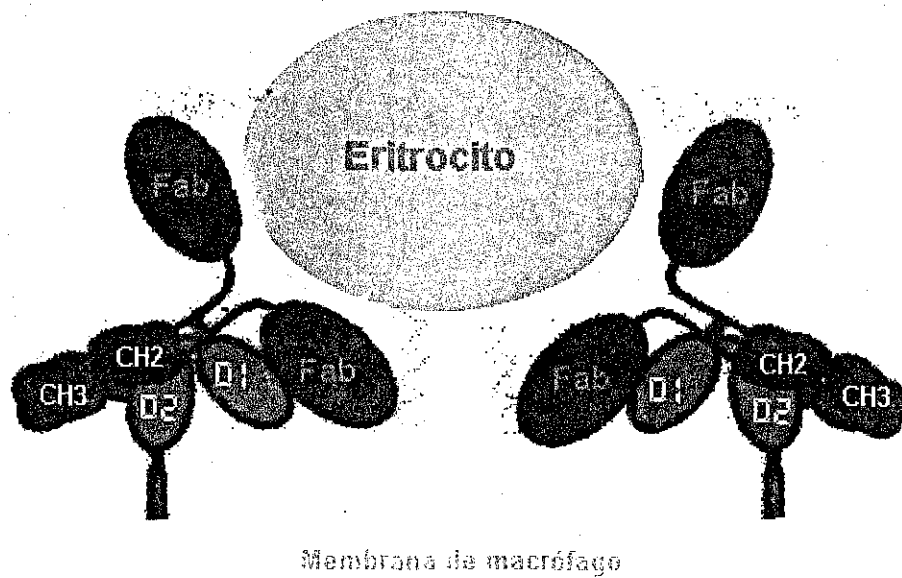


Figura 16. Entrecruzamiento de receptores. Los receptores FcγR presentes en la superficie de los macrófagos murinos, son entrecruzados por la partícula opsonizada con las distintas subclases de anticuerpos. Este entrecruzamiento puede adoptar distintas orientaciones y así producir una activación de la célula que desencadena una respuesta efectora como la fagocitosis con distinta eficiencia dependiendo de la flexibilidad de la subclase que opsoniza al eritrocito.

Estos resultados son consistentes ya que el efecto se observó en al menos tres experimentos. Una posible explicación de este efecto puede ser que la IgG1, al entrecruzar los receptores y por ser una molécula poco flexible, estuviera formando agregados que favorecieran el reclutamiento de fosfatasa de tirosina que participan en la regulación del sistema y por esto la baja eficiencia para mediar la fagocitosis. Al usar la herbimicina a bajas concentraciones podría estarse inhibiendo cinasas de tirosina que activaran estas fosfatasas y sin esta represión la fagocitosis podría ser más eficiente. Esta suposición se basa en que se ha descrito en monocitos humanos la

fosforilación en tirosina de la fosfatasa SHIP, después del entrecruzamiento de los receptores Fc γ RI y Fc γ RIIa, lo que puede llevar a una regulación negativa del sistema (Maresco et al, 1999). Otro posible mecanismo de reclutamiento de fosfatasas, podría ser a través del entrecruzamiento de receptores de tipo inhibitorio como son los receptores Fc γ RIIb, ya que en otros sistemas se ha visto que al entrecruzar estos receptores son capaces de reclutar diversas fosfatasas como SHP-1 y 2, así como SHIP y así nuevamente regular negativamente el sistema (Cambier JC 1997, Coggeshall KM 1998, Neel BG 1997). Sin embargo, para comprobar cualquiera de estas hipótesis sería necesario por un lado, probar la participación de fosfatasas en la activación por eritrocitos opsonizados con IgG1 junto con las cinasas que podrían estar regulando esta vía; por otro lado, sería necesario identificar más precisamente a través del uso de receptores únicos transfectados en células como CHO, cual o cuales receptores están formando los agregados y si son diferentes dependiendo de la subclase del anticuerpo opsonizante.

Como se ha mencionado anteriormente, existen en el ratón cuatro subclases de anticuerpos IgG, se ha observado una respuesta predominante por ciertas subclases dependiendo del estímulo al que se enfrenta al huésped. Por ejemplo, proteínas solubles de patógenos estimulan respuestas principalmente de IgG1 (Slack et al 1980), los carbohidratos inducen respuesta de IgG3 en el ratón (Perlmutter et al 1978), los virus y las bacterias gram negativas inducen una respuesta principalmente de IgG2a (Coutelier et al 1988

y Finkelman et al 1988) y los parásitos nematodos inducen predominantemente una respuesta de IgG1 (Zakroff et al, 1989).

Tomando en cuenta lo anterior, parecería que las propiedades estructurales de cada subclase de IgG las podrían hacer particularmente adecuadas para unir y destruir tipos particulares de antígenos o parásitos (Paul, 1999), dándole así un papel definido a cada subclase, cumpliendo con su papel en la respuesta inmune, de eliminar partículas extrañas. Sin embargo, este papel parece ser no tan definido ya que cabe recordar que también los parásitos y otros microorganismos son capaces de liberar moléculas o presentar antígenos en su superficie con el propósito de evadir la respuesta inmune por distintos mecanismos. El papel de las distintas subclases puede contribuir también para aumentar el daño al huésped en caso de enfermedades autoinmunes.

La correlación, sin embargo, entre las propiedades funcionales de una subclase particular y su expresión, no pueden tomarse como esenciales para la protección en contra de diferentes patógenos, como se demuestra en pacientes con deficiencia de alguna subclase de anticuerpos, en los que no se ha demostrado una mayor incidencia de infecciones que en personas con niveles normales de las distintas subclases de IgG (Nilssen et al, 1991). La redundancia en la variedad de subclases es una propiedad importante de las inmunoglobulinas para cumplir adecuadamente su función en el sistema inmune.

Actualmente existe un gran interés en el estudio de los anticuerpos monoclonales, ya que tienen un gran potencial en la terapia en contra de algunos tumores y para combatir enfermedades autoinmunes (Dyer et al, 1989). En enfermedades tumorales malignas, su uso se ha enfocado ampliamente a la eliminación de las células tumorales (Cobbold et al, 1992); en autoinmunidad, existe la posibilidad de utilizar anticuerpos monoclonales anti-anticuerpos para eliminar del organismo los auto-anticuerpos que estén produciendo el daño (Neuberger et al, 1984). La posibilidad de modificar genéticamente las proteínas de los anticuerpos abre todo un campo para el uso de los anticuerpos en terapia, sin embargo, para poder explotar estas posibilidades es necesario entender las bases estructurales de las funciones efectoras desencadenadas por las distintas subclases de anticuerpos monoclonales.

CONCLUSIONES

- La formación de rosetas a través de los Fc γ R fue similar para las distintas subclases de anticuerpos opsonizantes.
- La eficiencia para mediar la fagocitosis de los eritrocitos de carnero opsonizados, determinada tanto por el método microscópico como por el método colorimétrico es: IgG2b \geq IgG2a \ggg IgG1.
- Las diferencias observadas en la eficiencia para mediar fagocitosis por las distintas subclases no es debida a una diferente opsonización del eritrocito para cada subclase de anticuerpo.
- Para la fagocitosis de eritrocitos de carnero es necesaria la participación de los receptores Fc γ RII y/o Fc γ RIII, ya que al bloquear estos receptores con fragmentos del anticuerpo monoclonal (2.4G2) que reconoce un epítopo común en estos receptores se observa una total inhibición de la fagocitosis. Esto sugeriría que en nuestro sistema, el Fc γ RI no es suficiente para desencadenar la fagocitosis.
- No se observa un efecto de la reducción y alquilación de los puentes disulfuro de las distintas subclases de anticuerpos sobre la fagocitosis de eritrocitos opsonizados.
- La herbimicina es capaz de producir inhibición total de la fagocitosis mediada por los distintos anticuerpos opsonizantes.
- La herbimicina en concentraciones menores a las que se obtiene inhibición total, es capaz de aumentar la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG1.

BIBLIOGRAFIA

Aderem A. 1995. The MARKS family of protein kinase-C substrate. *Biochem Soc Trans.* 23:587-591.

Ades EW, Phillips DJ, Shore SL, Gordon DS, LaVia MF, Black CM, Reimer CB. (1976). Analysis of mononuclear cell surfaces with fluoresceinated Staphylococcal protein A complexed with IgG antibody or heat-aggregated γ -globulin. *J. Immunol.* 117:2119-2123.

Allen JM, Seed B. 1989. Isolation and expression of functional high affinity Fc receptor Complementary DNAs. *Science.* 243:378-380.

Allen LH, Aderem A. 1995. A role for MARKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *J Exp Med.* 182:829-840.

Amigorena S, Bonnerot C, Drake J, Choquet D, Hunziker W et al. 1992a. Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science.* 256:1808-1812.

Amigorena S, Salamero J, Davoust J, Fridman WH, Bonnerot C. 1992b. Tyrosine-containing motif that transduces cell activation signals also determines internalization and antigen presentation via type III receptors for IgG. *Nature.* 358:337-341.

Anderson P, Caligiuri M, O'Brien C, Manley T, Ritz J, Schlossman SF. 1990. Fc γ receptor type III (CD16) is included in the ζ NK receptor complex expressed by human natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:2274-2278.

Anderson CL, Shen L, Eicher DM, Wewers MD, Gill JK. 1990. Phagocytosis mediated by three distinct Fc γ receptor classes on human leucocytes. *J. Exp. Med.* 171:1333-1345.

Arend WP, Welgus HG, Thompson RC, Eisenberg SP. 1990. Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. *J. Clin. Invest.* 85:1694.

Assoian AK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, Miller Madtes DK, Raines EW, Ross R, Sporn MB. 1987. Expression and secretion of type β transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 6020.

Auger MJ & Ross JA. 1992. The biology of the macrophage. In: Lewis CE, McGee JO'D ed. Oxford University Press.

Brooks DG, Qiu WQ, Luster AD, Ravetch JV. 1989. Structure and expression of human IgG FcγRII (CD32). *J. Exp. Med.* 170:1369-1385.

Bruggemann MG, Williams GT, Bindon CI, et al. 1987. Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J. Exp. Med.* 166:1351-1361.

Cambier JC. 1997. Inhibitory receptors abound? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:5993-5.

Cambier JC, Daeron M, Fridman W, Gergely J, Kinet JP, et al. 1994. New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL). *Immunol. Today.* 16:110.

Canfield SM and Morrison SL. 1991. The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc receptor is determined by multiple amino acids in the CH2 domain and is modulated by the hinge region. *J. Exp Med.* 173:1483-1491.

Cassel DL, Keller MA, Surrey S, et al. 1993. Differential expression of FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIC in hematopoietic cells: analysis of transcripts. *Mol Immunol*30:451-460

Ceuppens JL, Baroja ML, van Vaeck F, Anderson CL. 1988. Defect in the membrane expression of high affinity 72 kD Fcγ receptors on phagocytic cells in four healthy subjects. *J. Clin. Invest.* 82:571-578.

Chothia C, Janin J. 1975. Principles of protein-protein recognition. *Nature.* 256:705-708.

Cobbold SP, Qin S, Leong LYW, Martin G, Waldmann H. 1992. Reprogramming the immune system for peripheral tolerance with CD4 and CD8 monoclonal antibodies. *Immunol Rev.* 129:165.

Coggeshall KM. 1998. Inhibitory signaling by B cell Fc gamma RIIB. *Curr Opin Immunol.* 10:306-12.

Collins K, Sellar JR, Matsudaira P. 1990. Calmodulin dissociation regulates brush border miosyn I (110-kD-calmodulin) mechanochemical activity in vitro. *J Cell Biol.* 110:1137-1147.

Cone JC, Lu Y, Trevillyan JM, Bjorndahl JM, Philips CA. 1993. Association of the p56lck protein tyrosine kinase with the FcγRIIIA/CD16 complex in human natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 23:2488-2497.

Coutelier JP, Vanderlogt TTM, Essen FWA, Vink A, Van Snick J. 1988. Virally induced modulation of murine IgG antibody subclasses. *J Exp Med.* 168:2373-2378.

Crothers DM, Metzger H. 1972. The influence of polyvalency on the binding properties of antibodies. *Immunochemistry.* 9:341-357.

Daeron M. 1995. Regulation of high affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low affinity IgG receptors. *J. Clin. Invest.* 95:577-585.

Daeron M, Malbec O, Bonnerot C, Latour S, Segal DM, Fridman W. 1994. Tyrosine containing activation motif-dependent phagocytosis in mast cells. *J. Immunol.* 152:783-792.

D'Ambrosio, Fong DC, Cambier JC. 1996. The SHIP phosphatase becomes associated with Fc gammaRIIB1 and is tyrosine phosphorylated during 'negative' signaling. *Immunol Lett.* 54:73-82.

D'Ambrosio, Hippen KL, Minskoff SA, Mellman I, Pani G, Siminovich KA, Cambier JC. 1995. Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by Fc gamma RIIB1. *Science.* 268:288-296.

Dangl JL, Wensel TG, Morrison SL, Stryer L, Herzenberg LA, Oi VT. 1988. Segmental flexibility and complement fixation of genetically engineered chimeric human, rabbit and mouse antibodies. *EMBO J.* 7:1989-1994.

Darby C, Geahlen RL, Schreiber AD. 1994. Stimulation of macrophage FcγRIIIA activates the receptor-associated protein tyrosine kinase Syk and induces phosphorylation of multiple proteins including p95VaV and p62/GAP associated protein. *J. Immunol.* 152:5429-5437.

Davis W, Harrison PT, Hutchinson MJ, Allen JM. 1995. Two distinct regions of FcγRI initiate separate signaling pathways involved in endocytosis and phagocytosis. *EMBO J.* 14:432-441.

de Vries JE. 1991. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 174:1209.

Deisenhofer J. 1981. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9-2.8 Å resolution. *Biochemistry*. 20:2361-2370.

Döhning C, Samaridis J, Colonna M. 1996. Alternatively spliced forms of human killer inhibitory receptors. *Immunogenetics*. 44:227-230.

Dyer MJS, Hale G, Hayhoe FGJ, Waldmann H. 1989. Effects of CAMPATH-1 antibodies in vivo in patients with lymphoid malignancies: influence of antibody isotype. *Blood*. 73:1431.

Edberg JC, Kimberly RP. 1994. Modulation of Fcγ and complement receptor function by the glycosyl-phosphatidylinositol-anchored form of FcγRIII. *J. Immunol*. 152:5826-5835.

Edberg JC, Lin CT, Lau D, Unkeless JC, Kimberly RP. 1995. The Ca²⁺ dependence of human Fcγ receptor-initiated phagocytosis. *J Biol Chem*. 270:22301-22307.

Edberg JC, Salmon JE, Kimberly RP. 1992. Functional capacity of Fcγ receptor III (CD16) on human neutrophils. *Immunol. Res.* 11:239-251.

Edmundson A. 1993. Three dimensional structure of a human Ig with a hinge deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90

Eisen HN. 1964. *Meth. Med. Res.* 10:115-121.

Ernst LK, Duchemin A-M, Anderson CL. 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.

Ernst LK, van de Winkel JGJ, Chiu I, Anderson CL. 1992. Three genes for the human high affinity Fc receptor encode four different transcription products. *J. Biol. Chem.* 267:15692-15700.

Feinstein A, Richardson N, Taussig MJ. 1986. Anti-idiotypic sera against monoclonal anti-progesterone antibodies: production in rabbits and rats and characterization of specificity *Immunol. Today*. 7:169-174.

Finkelman FD, Katona IM, Mosmann TR, Coffman RL. 1988. Interferon-γ regulates the isotypes of immunoglobulin secreted during in vivo humoral immune responses. *J. Immunol.* 140:1022-1027.

Fong DC, Malbec O, Arock M, Cambier JC, Fridman WH, Dairon M. 1996. Selective in vivo recruitment of the phosphatidylinositol phosphatase SHIP by

phosphorylated Fc gammaRIIB during negative regulation of IgE-dependent mouse mast cell activation. *Immunol Lett.* 54:83-91.

Fridman WH. 1991. Fc receptors and immunoglobulin-binding factors. *FASEB J.* 5:2684-2690.

Fridman WH, Bonnerot C, Daron M, Amigorena S, Teillaud JL, Sautes C. 1992. Structural bases of Fcγ receptor functions. *Immunol. Rev.* 125:49-76.

Fry AM, Lanier LL, Weiss A. 1996. Phosphotyrosines in the killer cell inhibitory receptor motif of NKB1 are required for negative signaling and for association with protein tyrosine phosphatase 1C. *J. Exp. Med.* 184:295-300.

Gabb HA, Jackson RM, Sternberg MJE. 1997. Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. *J. Mol. Biol.* 272:106-120.

Garay Canales Claudia A. 1994. Producción y Caracterización de Anticuerpos Monoclonales Murinos de la clase IgG, específicos para el 2,4-dinitrofenol. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM

Ghazizadeh S, Bolen JB, Fleit HB. 1994. Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with FcγRII in monocytic THP-1 cells. *J. Biol. Chem.* 269:8878-8884.

Ghirlando R, Keown MB, MacKay GA, Lewis MS, Unkeless MS, Gould HJ. 1995. Stoichiometry and thermodynamics of the interaction between the Fc fragment of human IgG1 and its low-affinity receptor FcγRIII. *Biochemistry.* 34:13320-13327.

Green SJ, Nancy CA, Meltzer MS. 1991. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxide in macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 50:93.

Greenberg S, Chang P, Wang DC, Xavier R, Seed B. 1996. Clustered syk tyrosine kinase domains trigger phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:1103-1107.

Greenwood J, Clark M, Waldmann H. 1993. Structural motifs involved in human IgG antibody effector functions. *Eur. J. Immunol.* 23:1098-1104.

Greshman HD, Graham IL, Anderson DC, Brown EJ. 1991. Leukocyte adhesion deficient (LAD) neutrophils fail to amplify phagocytic function in response to stimulation: evidence for CD11b/CD18-dependent and independent mechanism of phagocytosis. *J Clin Invest* 88:588-597.

Griffin FM Jr, Griffin JA, Leider JE, Silverstein SC. 1975. Studies on the mechanism of phagocytosis: I. Requirement for circumferential attachment of particle bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. *J. Exp Med* 142:1263-1282.

Griffin FM Jr, Griffin JA, Silverstein SC. 1976. Studies on the mechanism of phagocytosis: II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow-derived-lymphocytes. *J. Exp Med* 144:788-809.

Harrison PT, Davis W, Norman JC, Hockaday AR, Allen JA. 1994 Binding of monomeric immunoglobulin G triggers Fc γ RI-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* 269:24396-24402.

Hibbs ML, Selvaraj P, Carpen O, Springer TA, Kuster H, Jouvin MHE, Kinet JP. 1989. Mechanism for regulating expression of membrane isoforms of Fc γ RIII (CD16). *Science.* 246:1608-1611.

Hibbs ML, Tolvanen M, Carpen O. 1994. Membrane-proximal Ig-like domain of Fc γ RIII (CD16) contains residues critical for ligand binding. *J. Immunol.* 152:4466-4474.

Hogarth PM, Hulett MD, Ierino FL, Tate B, Powell MS, Brinkworth RI. 1992. Identification of the immunoglobulin binding regions (IBR) of Fc γ RII and Fc ϵ RI. *Immunol. Rev.* 125:21-35.

Hotchin NA, Hall A. 1996. Regulation of the actin cytoskeleton, integrins and cell growth by the Rho family of small GTPases. *Cancer Surv.* 27:311-322.

Hulett MD, Hogarth PM. 1994. Molecular basis of Fc receptor function. *Adv. Immunol.* 57:1-127.

Hulett MD, Osman N, Mckenzie IFC, Hogarth PM. 1991. Chimeric Fc receptors identify functional domains of murine Fc γ RI. *J. Immunol.* 142:1863-1868.

Hulett MD, Witort E, Brinkworth RI, Mckenzie IF, Hogarth PM. 1994. Identification of the IgG binding site of the human low affinity receptor for IgG Fc gamma RII. Enhancement and ablation of binding by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 269:15287-15293.

Hulett MD, Witort E, Brinkworth RI, Mckenzie IF, Hogarth PM. 1995. Multiple regions of human Fc gamma RII (CD32) contribute to the binding of IgG. *J. Biol. Chem.* 270:21188-21194.

Indik ZK, Park JG, Hunter S, Schreiber AD. 1995 The molecular dissection of Fc γ receptor mediated phagocytosis. *Blood*. 86:4389-4399.

Isakov N. 1997. ITIMs and ITAMs. The Yin and Yang of antigen and Fc receptor-linked signaling machinery. *Immunol Res*. 16:85-100.

Jefferis R, Lund J. 1997. Molecular definition of interaction sites on human IgG for Fc receptors (huFc γ R). *Mol. Immunol*. 27:1237-1240.

Jungi TJ. 1985. A rapid and sensitive method allowing photometric determination of erythrophagocytosis by mononuclear phagocytes. *J. Immunol. Meth.* 82: 141-148.

Kaplan G, Bertheussen K. 1977. The morphology of echinoid phagocytes and mouse peritoneal macrophages during phagocytosis in vitro. *Scand J Immunol*. 6:1289 - 1296

Karush F. 1976. Multivalent binding and functional affinity. *Contemp. Top. Mol. Immunol*. 5:217-228.

Katz HR, Vivier E, Castells MC, McCormick MJ, Chambers JM, Austen KF. 1996. Mouse mast cell gp49B1 contains two immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs and suppresses mast cell activation when coligated with the high-affinity Fc receptor for IgE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:10809-10814.

Keegan AD, Paul WE. 1992. Multichain immune recognition receptors: Similarities in structure and signalling pathways. *Immunol. Today*. 13:63-68.

Kiener PA, Rankin BM, Burkhardt AL, Schieven GL, Gilliland LK, Rowley RB, Bolen JB, Ledbetter JA. 1993. Crosslinking 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*. 268:24442-24448.

Kinet JP. 1992. The gamma-zeta dimers of Fc receptors as connectors to signal transduction. *Curr. Opin. Immunol*. 4:43-48.

Kurosaki T, Gander I, Wirthmueller U, Ravetch JV. 1992. The beta subunit of the Fc epsilon RI is associated with the Fc gamma RIII on mast cells. *J. Exp. Med*. 175:447-451.

Kurosaki T, Ravetch JV. 1989. A single amino acid in glycosyl phosphatidylinositol attachment domain determines the membrane topology of Fc γ RIII. *Nature*. 326:292-295.

Lanier LL, Yu G, Phillips JH. 1989. Co-association of CD3 ζ with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature*. 342:803-805.

Lazetic S, Chang C, Houchins JP, Lanier LL, Phillips JH. 1996. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J. Immunol*. 157:4741-4745.

Lennartz MR, Brown EJ. 1991. Arachidonic acid is essential for Fc-receptor-mediated phagocytosis by human monocytes. *J Immunol* 147:621-626.

Lennartz MR, Lefkowitz JB, Bromley FA, Brown EJ. 1993. Immunoglobulin G-mediated phagocytosis activates a calcium-independent, phosphatidylethanolamine-specific phospholipase. *J Leukoc Biol* 54:389-398.

Lew DP, Andersson T, Hed J, DiVirgilio F, Pozzan T, Stendahl O. 1985. Ca²⁺ dependent and Ca²⁺ independent phagocytosis in human neutrophils. *Nature*. 315:509-511.

Lewis C, McGee J. 1992. *The Biology of the Macrophage*. Oxford University Press, NY, Cap. 3-10.

Liao F, Shin HS, Rhee SG. 1992. Tyrosine phosphorylation of phospholipase C-g1 induced by crosslinking of the high or low affinity Fc receptor for IgG in U937 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:3659-3663.

Lund J, Winter G, Jones PT, Pound JD, Tanaka T, Walker MR, Artimiuk PJ, Arata Y, Burton DR, Jefferis R & Woof JM. 1991. Human Fc γ RI & Fc γ RII interact with distinct but overlapping sites on human IgG. *J. Immunol*. 147:2657-2662.

Maresco D, Osborne J, Cooney D, Coggeshall K, Anderson CL. 1999. The SH2-Containing 5'-Inositol Phosphatase (SHIP) is tyrosine phosphorylated after Fc γ receptor clustering in Monocytes. *J. Immunol*. 162:6458-6465.

Masuda M, Roor D. 1993. Association of all three types of Fc γ R (CD64, CD32, CD16) with a γ chain homodimer in cultured human monocytes. *J. Immunol*. 151:6382-6388.

Matsuda M, Park JG, Wang DC, Hunter S, Chien P, Schreiber AD. 1996. Abrogation of the Fc gamma receptor IIA-mediated phagocytic signal by stem-loop Syk anti-sense oligonucleotides. *Mol Biol Cell*. 7:1095-1106.

Maxwell KF, Powell M, Hulett MD, Barton PA, McKenzie IFC, Garrett TPJ, Hogarth M. 1999. Crystal structure of the human leucocyte Fc receptor, Fc γ RIIIa. *Nat. Struct. Biol*. 6:437-442.

Mayorga LS, Colombo MI, Lennartz M, et al. 1993. Inhibition of endosome fusion by phospholipase-a(2) (PLA2) inhibitors points to a role for PLA2 in endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:10255-10259.

Mellman I, Plutner H. 1984. Internalization and degradation of macrophage Fc receptors bound to polyvalent immune complexes. *J. Cell. Biol.* 98:1170-1177.

Metzger H. 1974. The effect of antigen binding on the properties of antibody. *Adv. Immunol.* 28:169-207.

Metzger H. 1986. Antibodies as effector molecules. *Harvey Lect. Ser.* 80:49-66.

Metzger H. 1992. Transmembrane signaling: The joy of aggregation. *J. Immunol.* 149:1477-1487.

Metzger H. 1992b. The receptor with high affinity for IgE. *Immunol. Rev.* 125:37-48.

Mimura Y, Sonderrmann P, Ghirlando R, Lund J, Young S, Goodall M, Jefferis R. 2001. Role of Oligosaccharide residues of IgG1-Fc in FcγRIIb binding. *J Biol Chem.* 276:45539-45547.

Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, Moretta L. 1996. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 14:619-648.

Muta T, Kurosaki T, Misulovin Z, Sanchez M, Nussenzweig MC, Ravetch JV. 1994. A 13-amino acid motif in the cytoplasmic domain of FcγRIIB modulates B-cell signalling. *Nature.* 368:70-73.

Nagarajan S, Chesla S, Cobern L, Anderson P, Zhu C, Selvaraj P. 1995. Ligand binding and phagocytosis by CD16 (Fcγ receptor III) isoforms. *J. Biol. Chem.* 270:25762-25770.

Nathan CF, Tsunawaki S. 1986. Secretion of toxic oxygen products by macrophages: regulatory cytokines and their effects on the oxidase. In: Evered D, Nugent J, JO'Connor M, eds. *Biochemistry of macrophages*. Ciba Foundation Symposium 118. London: Pitman, 211.

Neel BG. 1997. Role of phosphatases in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol.* 9:405-20.

Neuberger MS, Rajewsky K. 1981. Activation of mouse complement by monoclonal mouse antibodies. *Eur. J. Immunol.* 11:1012-1016.

Neuberger MS, Williams GT, Fox RO. 1984. Recombinant antibodies possessing novel effector functions. *Nature*. 312: 604.

Nezlin R. 1990. Internal movements in immunoglobulin molecules. *Adv Immunol*. 48:1

Nezlin R. 1998. *The Immunoglobulins, Structure and Function*. eds. Academic Press

Nilssen DE, Soderstrom R, Brandtzaeg P. 1991. Isotype distribution of mucosal IgG-producing cells in patients with various IgG subclass deficiencies. *Clin Exp Immunol*. 83:17-24

Ninomiya N, Hazeki K, Fukui Y, et al. 1994. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling. *J Biol Chem*. 269:22732-22737.

Oi VT, Vuong M, Hardy R, Dengl J, Reidler J, Stryer L, Herzenberg LA. 1982. Segmental flexibility and effector function of immunoglobulin isotypes containing identical antidansyl variable regions. *Fed. Proc*. 41:289 (Abstr).

Oi VT, Vuong M, Hardy R, Reidler J, Dengl J, Herzenberg LA, Stryer L. 1984. Correlation between segmental flexibility and effector function of antibodies. *Nature*. 307: 136-140.

Olcese L, Lang P, Vély F, Cambiaggi A, Marguet D, Blery M, Hippen KL, Biassoni Rm Moretta A, Moretta L, Cambier JC, Vivier E. 1996. Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases. *Immunol*. 156:4531-4534.

Ono M, Bolland S, Tempst P, Ravetch JV. 1996. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(gamma)RIIB. *Nature*. 383:263-266.

Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N, Matsushima K. 1991. Properties of the novel proinflammatory supergene intecrine cytokine family. *Annu. Rev. Immunol*. 9:617.

Ortega E. 1995. How does multichain immune recognition receptors signal: A structural hypothesis. *Mol. Immunol*. 32:941-945.

Paul WE. 1999. *Fundamental Immunology*. 4th Edition. Raven Press NY. 226, 832-833, 1003-1009, 1138, 1140-1141.

Perlmutter R, Hansburg D, Briles DE, Nicolotti R, Davie JM. 1978. Subclass restriction of murine anti-carbohydrate antibodies. *J. Immunol.* 128:2622-2628.

Poo H, Kraus JC, Mayo-Bond L, Todd RF, Petty HR. 1995. Interaction of Fc γ receptor IIIB with complement receptor type 3 in fibroblast transfectants: evidence from lateral diffusion and resonance energy transfer studies. *J. Mol. Biol.* 247:597-603.

Qiu WQ, de Bruin D, Brownstein BH, Pearse R, Ravetch JV. 1990. Organization of the human and mouse low-affinity Fc γ R genes: duplication and recombination. *Science.* 248:732-735.

Ra C, Jouvin M-H, Blank U, Kinet JP. 1989. A macrophage Fc γ receptor and the mast cell receptor for IgE share an identical subunit. *Nature.* 341:752-754.

Radaev S, Motyka S, Fridman WF, Sautes-Fridman C, Sun P. 2001. The Structure of a human type III Fc γ receptor in complex with Fc. *J Biol Chem.* 276: 16469-16477.

Raghavan M, Bjorkman PJ. 1996. Fc receptors and their interactions with immunoglobulins. *Annu. Rev. Cell. Dev.* 12:181-220.

Raulet DH, Held W. 1995. Natural killer cell receptors: the offs and ons of NK cell recognition. *Cell.* 82:697-700.

Ravetch JV. 1994. Fc receptors: rubor redux. *Cell.* 78:553-560.

Ravetch JV, Kinet JP. 1991. Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492.

Ravetch JV, Luster AD, Weinshank R, Kochan J, Pavlovec A, Portnoy DA, Hulmes J, Pan YCE, Unkeless JC. 1986. Structural heterogeneity and functional domains of murine immunoglobulin G Fc receptors. *Science.* 234:718-725.

Ravetch JV, Perussia B. 1989. Alternative membrane forms of Fc γ RIII (CD16) on human natural killer cells and neutrophils. *J. Exp. Med.* 170:481-497.

Renard V, Cambiaggi A, Vélv F, Blery M, Olcese L, Olivero S, Bouchet M, Vivier E. 1997. Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. *Immunol. Rev.* 155:205-221.

Reth MG. 1989. Antigen receptor tail clue. *Nature*. 338:383-384.

Roux K, Strelets L, Michaelsen T. 1997. Flexibility of human IgG subclasses *J Immunol*. 159:3372-3382.

Sarmay G, Lund J, Rozsnyay Z, Gergely J, Jefferis R. 1992. Mapping and comparison of the interaction sites on the Fc region of IgG responsible for triggering antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) through different types of human Fc γ receptor. *Mol. Immunol*. 29:633-639.

Schneider WP, Wensel TG, Stryer L, Oi VT. 1988. Genetically engineered immunoglobulins reveal structural features controlling segmental flexibility. *Proc Natl Acad Sci USA*. 8:2509-2513.

Scott WA, Pawlowski NA, Murray HW, Andreach M, Zrike J, Cohn ZA. 1982. Regulation of arachidonic acid metabolism by macrophage activation. *J. Exp. Med*. 155:1148.

Sears DW, Osman N, Tate B, McKenzie IF, Hogarth PM. 1990. Molecular cloning and expression of the mouse high affinity receptor for IgG. *J. Immunol*. 144:371-378.

Shen L, Guyre PM, Fanger MW. 1987. Polymorphonuclear leukocyte functions triggered through the high affinity Fc receptor for monomeric IgG. *J. Immunol*. 139: 534-538.

Shen Z, Lin CT, Unkeless JC. 1994. Correlations among tyrosine phosphorylation of Shc, p72syk, PLC-gamma 1, and (Ca²⁺) flux in the Fc gamma RIIA signaling. *J Immunol* 152:3017-3023.

Shimizu Y, Mobley JL, Finkelstein LD, Chan ASH. 1995. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of β 1 integrin activity by the CD2 antigen. *J Cell Biol*. 131:1867-1880.

Silverstein SC, Greenberg S, Di Virgilio F, Steinberg TH. 1989. Phagocytosis. In W.E. Paul (ed), *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York.

Silverstain SC, Steinman RM, Cohn ZA. 1977. Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem*. 46:669-722.

Slack JH, Der-Balian G, Nahm MH, Davie JM. 1980. Subclass restriction of murine antibodies. II. The IgG plaque-forming response to thymus-independent type 1 and type 2 antigen in normal mice and mice expressing an X-linked immunodeficiency. *J. Exp. Med*. 151:853-862.

Sondermann P, Huber R, Jacob U. 1999. Crystal structure of the soluble form of the human Fc γ -receptor IIb: a new member of the immunoglobulin superfamily at 1.7 Å resolution. *EMBO J.* 18:1095-1103.

Sondermann P, Jacob U, Kutscher C, Frey J. 1999b. Characterization of soluble Human Fc γ Receptor II (CD32) Isoforms Produced in Insect Cells. *Biochemistry.* 38:8469-8477.

Stahl PD. 1992. The mannose receptor and other macrophage lectins. *Curr. Opin. Immunol.* 4:49.i

Stuart S, Simister NE, Clarkson SB, Kacinski BK, Shapiro M, Mellman I. 1989. Human IgG Fc receptor (h Fc γ RII; CD32) exists as multiple isoforms in macrophages, lymphocytes and IgG-transporting placental epithelium. *EMBO J.* 8:3657-3666.

Susuki T. 1991. Signal transduction mechanism through Fc γ receptors on the mouse macrophage surface. *FASEB J.* 5:187.

Takai T, Li M, Sylvestre D, Clynes R, Ravetch JV. 1994. Fc γ R deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell.* 76:519-529.

Takai T, Ono M, Hikida M, Ohmori H, Ravech JV. 1996. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc γ RII-deficient mice. *Nature.* 379:346-349.

Takemura R, Werb Z. 1984. Secretory products of macrophages and their physiological function. *Am. J. Physiol.* 246:C1-C9.

Tripp CS, Unanue ER, Needleman P. 1986. Monocyte migration explains the changes in macrophage arachidonate metabolism during the immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:9655.

Unanue ER. 1981. The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation, part two: symbiotic relationship between lymphocytes and macrophages. *Adv. Immunol.* 31:1.

Unkeless JC, Scigliano E, Freedman VH. 1988. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu. Rev. Immunol.* 6:251-281.

Urbanek R. 1988. IgG subclasses and subclass distribution in allergic disorders. In *Monographs in Allergy*, Vol 23. Skvaril F, Morell A, and Perret B. Eds. S. Karger AG, Basel Switzerland.

Van Wilken JGJ, Anderson CL. 1991. Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *J. Leukocyte Biol.* 49:511-524.

Van Wilken JGJ, Capel PJA. 1993. Human IgG Fc receptor heterogeneity: Molecular aspects and clinical implications. *Immunol. Today.* 14:215-221.

Vivier E, Daeron M. 1997. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol. Today.* 18:286-291.

Wade RH, Taveau JC, Lamy JN. 1989. Concerning the axial flexibility of the Fab regions of immunoglobulin G. *J. Mol. Biol.* 206:349-356.

Waldmann H. 1989. Manipulation of T-cell responses with monoclonal antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 7:407-444.

Wang AV, Scholl PR, Geha RS. 1994. Physical and functional association of the high affinity immunoglobulin G receptor (Fc γ RI) with the kinase Hck and Lyn. *J. Exp. Med.* 180:1165-1170.

Wolpe SD, Cerami A. 1989. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB J.* 3:2565.

Wrigley NG, Brown EB, Skehel JJ. 1983. Electron microscopic evidence for the axial rotation and inter-domain flexibility of the Fab regions of immunoglobulin G. *J Mol Biol.* 169:771-774.

Yokoyama WM. 1995. Natural killer cell receptors. *Curr Opin. Immunol.* 7:110-120.

Zakroff SGH, Beck L, Spiegelberg HL. 1989. The IgE and the IgG subclass responses of mice to four helminth parasites. *Cell Immunol.* 199:193-198.

Zhelezniak A, Brown EJ. 1992. IgG-mediated phagocytosis by human monocytes requires protein kinase C activation: evidence for protein kinase C translocation to phagosomes. *J Biol Chem.* 267:12042-12048.

Zhou MJ, Todd RF, van de Winkel JGJ Petty HR. 1993. Cocapping of the leukoadhesin molecules complement receptor type 3 and lymphocyte function-associated antigen-1 with Fc γ receptor III on human neutrophils. Possible role of lectin-like interactions. *J. Immunol.* 150:3030-3041.

APÉNDICE

SOLUCIONES:

Alsevers

20.5 g Dextrosa

4.2 g NaCl

8 g Citrato de Sodio • 2 H₂O

0.55 g Ac. Cítrico • H₂O

Ajustar pH=6-6.2, aforar 1 lt, esterilizar por filtración y conservar a 4°C

DGVB²⁺

2.5 mM Veronal (Barbital)

75 mM NaCl

2.5 % Dextrosa

0.05% Gelatina

0.15 mM CaCl₂

0.5 mM MgCl₂

Calentar a no más de 45° C, ajustar pH=7.5, esterilizar por filtración y conservar a 4° C.

Buffer de boratos

0.2 M Ac. Bórico

0.15 M NaCl

Ajustar pH=8.5, conservar a 4° C.

Medios de cultivo:

D-MEM

Sobre de Medio GIBCO

3.7 g NaHCO₃

Ajustar pH=7.1-7.2. Aforar 1 lt. Esterilizar por filtración. Hacer prueba de esterilidad por 3-5 días a temperatura ambiente. Conservar cubierto de la luz.

RPMI 1640

Sobre de Medio GIBCO

2.2 g NaHCO₃

5.95 g Hepes

10⁻⁶ M Mercaptoetanol

Ajustar pH=7.4. Aforar 1 lt. Esterilizar por filtración. Hacer prueba de esterilidad por 3-5 días a temperatura ambiente. Conservar protegido de la luz.

PBS 20X

7.2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
22g Na_2HPO_4 anhidro
175 g NaCl
Ajustar pH=7.4-7.5, aforar 1 lt.

Solución de lisis (ensayo de fagocitosis y rosetas, determinación colorimétrica):

0.3 % de SDS en PBS

Agregar 100 μl por pozo de esta solución y agitar por unos minutos.

Solución de revelado de fagocitosis y rosetas:

4 mg 3,3'-Diaminobencidina
20 μl H_2O_2
10 ml PBS

Agregar 200 μl por pozo de esta solución y agitar por unos minutos hasta que se observe una coloración café, medir a 492 nm.

Buffer de Dietanolamina:

100 ml Dietanolamina
102 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
0.4 g NaN_3
700 ml H_2O desionizada

Ajustar pH= 9.8 con HCl concentrado, aforar a 1 lt con H_2O desionizada, conservar a temperatura ambiente cubierto de la luz.