



03062 10  
2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y  
DE POSGRADO DEL CCH**

**ACTIVACION DE CELULAS CEBADAS A TRAVES DE  
RECEPTORES DE ALTA AFINIDAD PARA IgE Y  
RECEPTORES PARA IgG.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :  
**MAESTRIA EN INVESTIGACION  
BIOMEDICA BASICA**  
P R E S E N T A :  
**Q.F.B. MARTHA ISABEL LARA PADILLA**

**TUTOR PRINCIPAL:  
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

Esta tesis fue realizada en el departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, con el asesoramiento del comité tutorial, integrado por:

DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

TUTOR PRINCIPAL

DR. JUAN PEDRO LACLETTE SAN ROMAN

DR. RUY PEREZ MONTFORT

El trabajo de esta tesis fue realizado con el financiamiento otorgado por CONACYT (1072-N9201) y DGAPA (IN204293 e IN204696), así como por las becas otorgadas por PAPIIT-DGAPA y CONACYT.

Dedico esta tesis a mi familia. A mis padres, por su paciencia. A mis hermanos, por el apoyo que me dieron.

Enrique:

Gracias por todos los conocimientos que me brindaste; por el apoyo y los ánimos que me diste durante todo este tiempo. Gracias mil.

A mis tutores:

Gracias por sus ideas y sus críticas tan acertadas.

Quiero agradecer a mis amigos y compañeros de laboratorio el apoyo y la ayuda brindada: C. Garay, C. Hallal, Irene, Mariana, Claudine, Manuel, Armida, Carla, Gino, Isabel, Rocío. Gracias a todos.

A mis amigos, que siempre me animaron cuando lo necesité: Edgar, Lulú, Dolores, Gina y todas las clicas del laboratorio de Bertha. A Alfredo, Verito y todos mis cuates del Instituto.

Un sincero agradecimiento a las secretarias del Departamento de Inmunología: Isabel y Amada, por todos los ratos que les estuve estorbando en la oficina.

Quiero dar las gracias también a mis sinodales, ya que gracias a sus críticas pude mejorar la presentación de mi trabajo.

Un agradecimiento muy especial a mis hermanitos: Noel, Teté, Abigail, Beto, Gerardo, Adrian, Daniel, Fredy, Pedro, Tania, Clarissa, Carlos e Iraís.

Gracias Jaime.

## ÍNDICE

ABREVIACIONES UTILIZADAS.	I
RESUMEN.	III
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES.	I
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y METODOS.	24
CAPÍTULO 3. RESULTADOS.	36
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN.	51
CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFÍA.	62
APÉNDICE I. REACTIVOS.	74
APÉNDICE II. AMORTIGUADORES, MEDIOS Y SOLUCIONES.	75

## ABREVIACIONES UTILIZADAS

ADN: Acido desoxirribonucleico.  
Ag: Antígeno.  
BCR: Receptor de antígeno de células B.  
BSA: Albúmina sérica bovina.  
CCM: Células cebadas de mucosa.  
CCTC: Células cebadas de tejido conectivo.  
C<sub>1</sub>: Región constante de la cadena ligera de la Ig.  
C<sub>2</sub>: Región constante de la cadena pesada de la Ig.  
DAB: Diamino benzidina.  
DAG: Diacil glicerol.  
DNP: 2,4-Dinitro fenol.  
EGF-R: Receptor del factor de crecimiento epidermal.  
ELISA: Ensayo de inmunoadsorción de enzimas.  
FcεRI: Receptor tipo I para el Fc de la IgE.  
FcγRI: Receptor tipo I para el Fc de la IgG.  
FcγRII: Receptor tipo II para el Fc de la IgG.  
FcγRIII: Receptor tipo III para el Fc de la IgG.  
FcγRs: Receptores para la porción Fc de las IgGs.  
FCS: Suero fetal bovino.  
GAP: Proteína activadora de GTPasas.  
GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.  
GPI: Glicosil fosfatidil inositol.  
GRC: Glóbulos rojos de carnero.  
GTP: Guanosina trifosfato.  
Ig: Inmunoglobulina.  
IL: Interleucina.  
INF-γ: Interferon gamma.  
IP<sub>3</sub>: Inositol 1,4,5-trifosfato.  
IR: Receptor de insulina.  
ITAM: Motivos inmunes de activación en tirosina.  
JAK: Cinasa de la familia Janus.  
K<sub>a</sub>: Constante de afinidad.  
LIF: Factor inhibidor de leucemia.  
LTB<sub>4</sub>: Leucotrieno B<sub>4</sub>  
LTC<sub>4</sub>: Leucotrieno C<sub>4</sub>  
MAP-K: Proteína cinasa activada por mitógeno.  
MEM: Medio mínimo esencial.  
MHC: Complejo principal de histocompatibilidad.  
mIgM: Inmunoglobulina de membrana.  
MIRRs: Receptores multcadena de reconocimiento inmune.  
NK: Células asesinas naturales.

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida.  
PBS: Amortiguador salino de fosfatos.  
PDGF-R : Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas.  
PGD<sub>2</sub>: Prostaglandina D<sub>2</sub>.  
PI3K: Fosfatidil inositol 3 cinasa.  
PKC: Proteina cinasa C.  
PLC-  $\gamma$ : Fosfolipasa C  $\gamma$ .  
PMA: Acetato de forbol miristato.  
PTK: Cinasa de tirosina.  
RBL-2H3: Células cebadas de rata leucémica de la clona RBL-2H3.  
rpm: Revoluciones por minuto.  
SC: Suero de caballo.  
SDS: Dodecil sulfato de sodio.  
SH2: Dominio de unión a fosfotirosina.  
SH3: Dominio de unión a regiones proteicas ricas en prolina.  
STAT: Transductores de señales y activadores de la transcripción.  
TCR: Receptor de antígeno de células T.  
TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento tumoral beta.  
TNBS: Acido 2,4,6-trinitro bencen sulfónico.  
TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa.  
TNP: 2,4,6-Trinitro fenol.  
V: Volts.  
VH: Región variable de la cadena pesada de la Ig.  
VL: Región variable de la cadena ligera de la Ig.

## RESUMEN

### ACTIVACIÓN DE CÉLULAS CEBADAS A TRAVÉS DE RECEPTORES DE ALTA AFINIDAD PARA IgE Y RECEPTORES PARA IgG.

El receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI) pertenece a la familia de receptores de reconocimiento inmune (MIRRs), cuyos miembros carecen de actividad intrínseca de cinasa. La agregación del FcεRI en células cebadas y basófilos da como resultado la activación de cinasas de tirosina de las familias *Src* y *Syk*, con la subsecuente fosforilación en tirosina de numerosas proteínas celulares, culminando con la secreción de mediadores inflamatorios. El FcεRI es un complejo tetramérico formado por una cadena α, la cual une la IgE, una cadena β y un homodímero de cadenas γ. Esta última subunidad también forma parte de los receptores para IgG: el FcγRI y el FcγRIII. Las células cebadas de la línea RBL-2H3 expresan FcεRI y FcγR de forma nativa.

Aunque las células cebadas se habían considerado como células no fagocíticas, Däeron y col. (1993, 1994) demostraron recientemente que las células cebadas de la línea RBL-2H3 transfectadas con FcγR murinos pueden fagocitar glóbulos rojos de carnero (GRC) opsonizados con IgGs murinas. Basándonos en este reporte, analizamos comparativamente la fagocitosis de GRC opsonizados con IgG e IgE murinas, mediada a través de los FcγR y FcεRI de las células RBL-2H3.

Nuestros resultados muestran que las células RBL-2H3 pueden unir y fagocitar GRC opsonizados con IgG y GRC opsonizados con IgE específicamente mediante los receptores nativos: FcγR y FcεRI, respectivamente. La fagocitosis mediada por el FcεRI induce también la secreción de la enzima β-hexosaminidasa, la cual se encuentra almacenada en los gránulos de secreción. La fagocitosis y la liberación de β-hexosaminidasa requieren de una temperatura fisiológica (37°C) y de la activación de cinasas de tirosina para poder llevarse a cabo. La función fagocítica es independiente de la presencia de iones de Ca<sup>2+</sup> en el medio,



mientras que la secreción de  $\beta$ -hexosaminidasa es  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente. Estos datos sugieren que las vías fagocíticas y secretoras disparadas por la agregación de los  $\text{Fc}\gamma\text{R}$  y  $\text{Fc}\epsilon\text{R1}$ , divergen en algún punto de la cascada de señales; de tal manera que los  $\text{Fc}\gamma\text{R}$  pueden mediar la fagocitosis, pero no inducir la secreción de  $\beta$ -hexosaminidasa.

# ACTIVACION DE CELULAS CEBADAS A TRAVÉS DE RECEPTORES DE ALTA AFINIDAD PARA IgE Y RECEPTORES PARA IgG.

## CAPITULO I

### ANTECEDENTES

#### 1.1. La agregación de receptores como un mecanismo de transducción de señales.

Una célula no es una entidad aislada, sino que interactúa con el medio ambiente que le rodea, y debe tener la capacidad de responder a estímulos de ese medio ambiente. Para esto, la célula posee en su membrana proteínas especializadas (receptores) que detectan la presencia o el cambio de concentración de algún compuesto o molécula (ligando) en el exterior y lo traducen en alguna respuesta en el interior de la célula.

El estudio de los mecanismos por los cuales la unión de cierto ligando a receptores de membrana inicia una serie de respuestas celulares, es uno de los campos de investigación más dinámicos actualmente. Un mecanismo común a través del cual distintos receptores de membrana inician la respuesta celular, es la oligomerización o dimerización de los receptores inducida por la unión del ligando (Revisado por Metzger, 1992 y Heldin, 1995).

Existen una serie de receptores para factores de crecimiento tales como el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R), el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF-R), el receptor de insulina (IR), etc., cuyo dominio intracelular tiene actividad intrínseca de cinasa de tirosina. En estos receptores, la unión del ligando induce la dimerización, seguida por la autofosforilación del receptor. El mecanismo por el cual la dimerización induce la autofosforilación, no se conoce. Una posibilidad es que el receptor monomérico tenga una actividad basal de cinasa de tirosina, la cual sea suficiente para

fosforilar al receptor contiguo mediante transfosforilación (Revisado por Heldin, 1995). Alternativamente, la interacción entre los dominios intracelulares de los receptores una vez formado el dímero, puede inducir un cambio conformacional que conlleve un incremento en la actividad de cinasa (Baron y col., 1992) lo que permitiría la autofosforilación del receptor (Murakami y col., 1991).

En el caso del receptor para insulina, la fosforilación del receptor en residuos de tirosina y serina permite la interacción del receptor con proteínas citosólicas. Esta interacción se establece entre residuos de fosfotirosinas en el receptor y dominios SH2 o entre dominios ricos en prolina y dominios SH3. Entre las proteínas citosólicas que interactúan con el receptor fosforilado están GRB2, Shc y Sos, las cuales forman un complejo que podría acoplar al receptor con la vía de activación de *ras*. La proteína *p21<sup>ras</sup>* forma parte de una superfamilia de GTPasas involucradas en el control del crecimiento, proliferación y diferenciación celular. Esta proteína está anclada a la parte interna de la membrana plasmática, donde participa en la transducción de señales al pasar de su estado activo (unida a GTP) al estado inactivo (unida a GDP). Se ha visto que esta proteína tiene una actividad basal de GTPasa, la cual se ve incrementada al interactuar con la proteína *GAP*. La proteína *p21<sup>ras</sup>* es el centro de convergencia de diferentes vías de activación, y se ha visto que una de las moléculas que actúan abajo de ésta proteína en la vía de activación es la cinasa de serina y treonina *raf*, la cual va a activar la cascada de las cinasas *MAP*, trayendo como consecuencia final la activación de genes de expresión temprana como *fos* y *jun* (Baltensperger y col., 1993; Skolnik y col., 1993).

En otros receptores para factores de crecimiento, tales como el PDGF-R y el EGF-R, la dimerización y la autofosforilación del receptor induce un incremento en la actividad catalítica del receptor, que puede fosforilar y activar otras enzimas involucradas en la vía de señalización, tales como fosfolipasa C $\gamma$  (*PLC $\gamma$* ), la proteína activante de *ras* (*GAP*), la fosfatidil inositol 3 cinasa (*PI3K*), *Raf*, y algunos miembros de la familia de cinasas de tirosina *Src*. La fosforilación induce un aumento de la actividad catalítica de estas enzimas (App y col., 1991; Kazlauskas y col., 1992).

Otros receptores, cuyo dominio intracitoplásmico no tiene actividad de cinasa, presentan sin embargo, mecanismos de activación similares. Tal es el caso de los receptores para: IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, GM-CSF, INF- $\gamma$ , INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , hormona del crecimiento y prolactina, entre otros. La unión del ligando al receptor induce la dimerización, y una vez formado el dímero se activan cinasas que fosforilan tanto al receptor como a una serie de proteínas citoplasmáticas entre las cuales se encuentran cinasas de tirosinas de las familias *JAK* y *Src*. Estas cinasas se asocian al dominio citoplasmático del receptor, fosforilando a su vez a una serie de sustratos involucrados en la activación celular (Ihle y col., 1994; Ziemiecki y col., 1994; Taniguchi y col., 1995).

Otros receptores en los que la agregación es el evento que induce la activación, son los receptores multicadena de reconocimiento inmune (MIRRs), los cuales están involucrados en la activación de células del sistema inmune. Miembros de esta familia son los receptores de antígeno de linfocitos B y T (BCR y TCR), el receptor de alta afinidad para IgE, y los receptores para IgG.

Los MIRRs no tienen actividad enzimática intrínseca, pero su agregación induce la activación de cinasas de tirosina de la familia *Src* y de la familia *Zap-70/Syk*. Estas cinasas inician una cascada de reacciones bioquímicas que resulten en la activación de diversas funciones celulares: proliferación y/o diferenciación, secreción de citocinas, liberación de metabolitos proinflamatorios, citotoxicidad, etc.

El mecanismo por el cual la agregación de estos receptores induce la activación de las cinasas, no se conoce con precisión. Se ha propuesto que la agregación permite que cinasas asociadas a la porción citoplasmática de los receptores se autofosforilen por transfosforilación, iniciándose así la cascada de activación.

## 1.2. Receptores multicadena de reconocimiento inmune.

Los receptores multicadena de reconocimiento inmune (MIRRs) participan en la activación de células del sistema inmune inducida por antígeno. El receptor de antígeno de linfocitos T (TCR) y la inmunoglobulina de superficie de linfocitos B (mIgM) participan en el reconocimiento del antígeno y son responsables de la activación inmunológica de tales células. Los otros MIRRs unen la porción Fc de las inmunoglobulinas, y reconocen de manera indirecta al antígeno para el cual es específica tal inmunoglobulina. Entre estos últimos se encuentran el receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI) y los receptores para el Fc de la IgG (FcγRs) (Revisado por Keegan y Paul, 1992; y Sandor y Lynch, 1993), (Ver Figura 1).

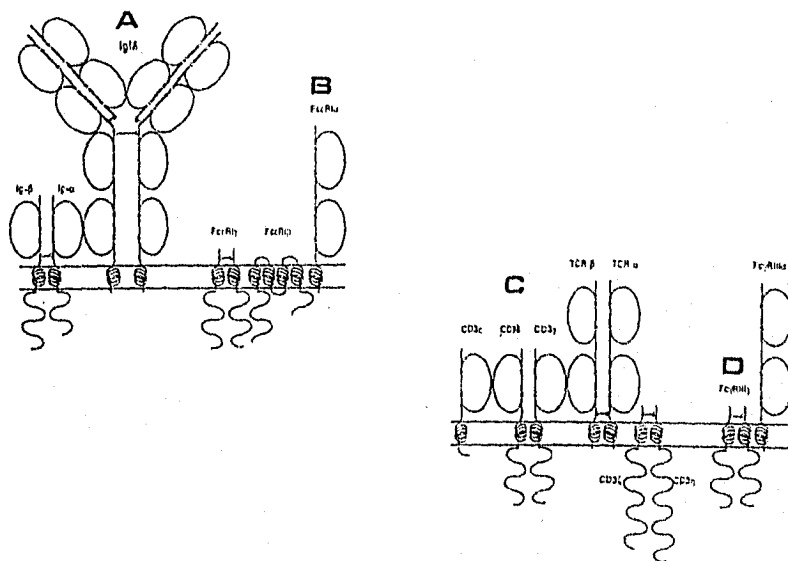
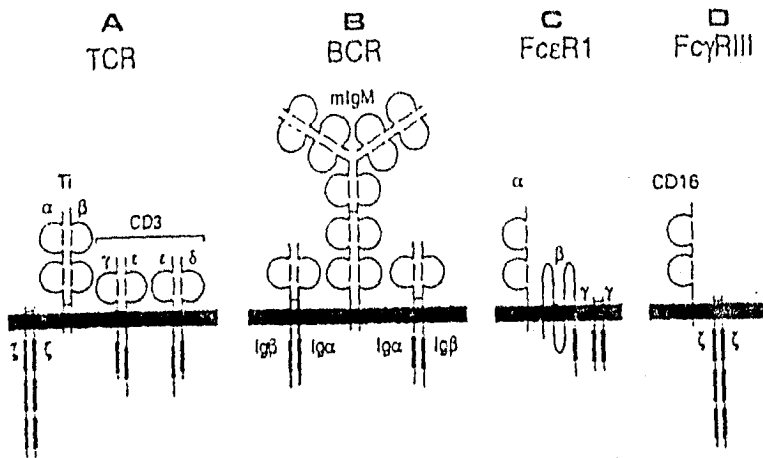


Figura 1. Receptores multicadena de reconocimiento inmune. Esquema que muestra la estructura de los receptores multicadena de reconocimiento inmune (MIRRs). A: IgM: Receptor de antígeno de linfocitos B; B: FcεRI: Receptor de alta afinidad para el Fc de la IgE; C: TCR: Receptor de antígeno de linfocitos T; D: FcγRIII: Receptor tipo III para el Fc de la IgG.

### 1.2.1. Receptor de antígeno de linfocitos T (TCR).

El TCR está formado por las cadenas de unión al ligando  $\alpha\beta$  ó  $\gamma\delta$ , el complejo CD3 (formado por las cadenas  $\gamma,\delta,\epsilon$ ) y un dímero de cadenas de la familia  $\zeta$  ( $\zeta-\zeta$  ó  $\zeta-\eta$ ). Mientras que los heterodímeros  $\alpha\beta$  ó  $\gamma\delta$  son los responsables de reconocer el péptido antigénico (Ag) expresado por una célula presentadora de antígeno en el contexto de una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), el CD3 y las cadenas  $\zeta$  son las responsables de la transducción de señales.

Las cadenas  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ , así como  $\gamma,\delta,\epsilon$  del CD3 forman parte de la superfamilia de las Igs, ya que tienen en su porción extracelular dominios de Ig (Figura 1). Por otro lado, las cadenas  $\gamma,\delta,\epsilon$  del CD3 y las cadenas  $\zeta$  y  $\eta$  poseen en su región citoplasmática un dominio de 18 aminoácidos que contiene 2 pares de leucinas y tirosinas, las cuales son necesarias para la actividad funcional del motivo (Romeo y col., 1992; Irving y col., 1991). Este motivo ha sido denominado ITAM (Immunoreceptor Tyrosine Activation Motif) y fue identificado por primera vez por Reth (1989) (Figura 2). La agregación del TCR induce la fosforilación en los residuos de tirosina del ITAM. Además, se ha visto que receptores quiméricos que contienen en su región citoplasmática un ITAM de la cadena  $\zeta$ , pueden dar lugar a las mismas respuestas que se inducen al agregar el TCR, aunque la intensidad de éstas es menor. El entrecruzar receptores quiméricos que contienen en su región citoplasmática 2 o 3 ITAMs, da como resultado el incremento de la respuesta, hasta igualar la obtenida con la cadena  $\zeta$  completa. Basándose en los datos anteriores, se ha sugerido que la presencia de varios ITAMs en el TCR es importante para brindar una amplificación de la señal, de modo que el entrecruzamiento de unos pocos receptores produzca una respuesta suficientemente amplia (Revisado por Weiss, 1993).



**Figura 2.** Receptores de antígeno de células hematopoyéticas. Los ITAMs están indicados como rectángulos negros. A: TCR: Receptor de antígeno de linfocitos T; B: BCR: Receptor de antígeno de linfocitos B; C: FcεR1: Receptor de alta afinidad para el Fc de la IgE; D: FcγRIII: Receptor tipo III para el Fc de la IgG.

La agregación del TCR induce la fosforilación inmediata de proteínas en residuos de tirosina. Entre las proteínas fosforiladas están las cadenas del receptor que contienen los ITAMs, y cinasas de tirosina de la familia *Src*, tales como *lck* y *fyv*. Se sabe *lck* se asocia al CD4 y al CD8 en linfocitos T (Veillette y col., 1988; Gleichenhans y col., 1991), mientras que *fyv* se asocia a las cadenas ε y γ del CD3 y a la cadena ζ (Kosayu y col., 1992; Timson y col., 1992). Se ha visto a otra cinasa de tirosina llamada *Zap-70* en inmunoprecipitados de receptores agregados por anticuerpos anti-TCR o anticuerpos anti-CD3ε (Wange y col., 1992) observándose que ésta cinasa se asocia a las cadenas ζ sólo cuando éstas se encuentran fosforiladas (Chan y col., 1991; Chan y col., 1992; Wange y col., 1993). Otros resultados muestran que al estimular el TCR (Weber y col., 1992) o al entrecruzar el CD3 se

puede detectar a la *PLC $\gamma$*  fosforilada (Dasgupta y col., 1992), de lo cual se infiere que esta proteína está involucrada en las vías de activación inducidas por la estimulación del TCR, ya que estudios con receptores quiméricos los cuales contienen en su porción intracitoplasmática las secuencias de la cadena  $\zeta$  o de las cadenas del CD3, han permitido establecer que estas cadenas están involucradas en la transducción de señales. Como ya se dijo anteriormente, estas cadenas contienen ITAMs en su dominio citoplasmático, los cuales pueden asociarse a cinasas cuando se encuentran fosforilados en residuos de tirosina, además de que se ha observado que receptores quiméricos que contienen la región citoplasmática de estas cadenas, son capaces de transmitir señales de activación al interior de la célula cuando son entrecruzados.

De igual manera, el uso de receptores quiméricos que contienen en la región citoplásmica las secuencias de cinasas de tirosina nos indican que moléculas de las vías de activación son importantes ó suficientes para que se lleve a cabo la transducción de señales al interior de la célula. Actualmente se conoce que el dominio citoplasmático de la cadena  $\zeta$  es suficiente para acoplar la vía de transducción de señales inducida por la agregación del TCR (Irving y col., 1991).

Se sabe también que receptores quiméricos que contienen en su porción intracelular las secuencias de *Zap-70* son capaces de inducir la movilización de iones  $\text{Ca}^{2+}$  al ser entrecruzados, pero no son capaces de inducir los mismos patrones de fosforilación obtenidos cuando se agrega el TCR. Para que ésto suceda, es necesario que se coagregen receptores quiméricos que contengan la secuencia de *Zap-70* y otros que contengan la secuencia de *Fyn* (Kolanus y col., 1993). Los resultados anteriores sugieren que aunque la cinasa *Zap-70* es capaz de inducir una respuesta de la célula, no induce la totalidad de la actividad celular, sino que necesita de la ayuda de otras cinasas, como *Fyn*.

Weiss ha sugerido un modelo de activación a través del TCR en el cual la interacción del complejo MHC-péptido con el TCR, induce la coagregación de los coreceptores CD4 ó CD8. La coagregación del CD4 ó el CD8 al TCR permite la interacción del la cinasa *Lck*



con las cadenas del CD3 y con las cadenas  $\zeta$ , así como con su cinasa asociada *Fyn*. Se fosforilan los ITAMs de las cadenas del CD3 y de  $\zeta$ , permitiendo la asociación y activación de *Zap-70*, la cual podría interactuar con moléculas que se encuentran más abajo en la vía de activación, tales como la *PLC $\gamma$ 1* (Weiss, 1993).

### 1.2.2. Receptor de antígeno de células B (BCR).

El BCR consiste de una Ig de membrana (mIg), asociada a heterodímeros de cadenas  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$  (Campbell y col., 1991) (Figura 1). La mIg consiste de 2 cadenas pesadas que forman un homodímero y 2 cadenas ligeras, cada una de las cuales está unida covalentemente a una de las cadenas pesadas. Hacia el extremo amino terminal de la cadena pesada se encuentra la región variable (VH), seguida de 4 (IgM, IgE) ó 3 (IgG, IgA, IgD) dominios constantes (CH), dependiendo del isotipo. La cadena ligera está formada por una región variable (VL) y una región constante (CL). El sitio de unión al antígeno está formado por los dominios hipervariables de un par de regiones VH:VL. Luego entonces, cada mIg tiene 2 sitios de unión al antígeno (Revisado por Reth, 1992).

Las porciones intracitoplasmáticas de mIgM y mIgD constan de sólo 3 aminoácidos, mientras que las mIg de otros isotipos tienen tallos citoplasmáticos más largos. Los receptores mIgG, mIgE y mIgA son expresados después del cambio de isotipo de las células B activadas, y una vez que se expresan estos isotipos en membrana son consideradas células de memoria (Revisado por Reth, 1992).

Las cadenas  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$  son los productos de los genes *mb-1* y *B29*, respectivamente (Campbell y col., 1991). La región extracelular de ambas proteínas contiene un dominio de Ig. El segmento transmembranal es seguido por un tallo citoplasmático de 61 o 48 aminoácidos, el cual contiene 4 o 2 residuos de tirosina para  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$ , respectivamente. El tallo citoplasmático de estas cadenas contiene el mismo motivo (ITAM) encontrado en las cadenas del CD3 y  $\zeta$  del TCR (Figura 2) (Revisado por Reth, 1992) En estudios de

transfección se ha visto que la  $Ig\alpha$  es necesaria para que la  $mIg$  se exprese en membrana (Revisado por Keegan y Paul, 1992; Lin y col., 1992).

La región transmembranal de la  $mIg$  es casi idéntica en todos los isotipos. Esta región conservada tiene 7 aminoácidos hidrofóbicos y 4 aminoácidos polares, pudiendo ser la región que interactúa con el heterodímero  $Ig\alpha/Ig\beta$ . Se ha sugerido que la interacción entre la  $mIg$  y el heterodímero asociado es mediada por la  $Ig\alpha$ , porque la parte transmembranal de esta cadena contiene aminoácidos polares a ambos lados de la  $\alpha$ -hélice, mientras que  $Ig\beta$  contiene aminoácidos polares sólo en uno de los lados. Como la  $mIg$  tiene dos superficies idénticas, se presume que se puede asociar a dos pares de cadenas  $Ig\alpha/Ig\beta$  (Revisado por Reth, 1992).

El tallo citoplasmático de la  $mIgM$  sólo contiene 3 aminoácidos, lo cual sugiere que otras moléculas son las encargadas de transmitir las señales del BCR al interior de la célula. Actualmente se acepta que el heterodímero  $Ig\alpha/Ig\beta$  asociado a la  $mIgM$  es el responsable de la transducción de señal (Revisado por Pleiman y col., 1994a; Sánchez y col., 1993; Kim y col., 1993; Williams y col., 1994), y que es funcionalmente homólogo a las proteínas involucradas en transducción de señales por el TCR (Burkhardt y col., 1994). Se han encontrado cinasas de la familia *Src* asociadas al BCR, tales como *Blk*, *Lyn*, *Fyn* y *Lck* (Burkhardt y col., 1991; Lin y col., 1992; LePrince y col., 1992). Mediante el uso de receptores quiméricos se ha demostrado que  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$  pueden inducir la activación de vías de señalización diferentes, ya que el dominio citoplasmático de  $Ig\beta$  puede disparar el incremento de  $Ca^{2+}$  en el citosol, pero no inducir la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, evento que es inducido por el dominio citoplasmático de  $Ig\alpha$  (Sánchez y col., 1993; Kim y col., 1993). Asimismo, se ha visto que a  $Ig\alpha$  se asocian *Lyn*, *Fyn*, *PI3K* y una fosfoproteína no identificada de 38 kDa, y que a  $Ig\beta$  se unen *PI3K* y dos fosfoproteínas no identificadas de 40 y 42 kDa (Kim y col., 1993; Clark y col., 1992). Receptores quiméricos conteniendo la secuencia citoplasmática de  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$  inducen incrementos similares de iones de  $Ca^{2+}$  en el citosol y la fosforilación de *MAPK*, eventos que parecen ser controlados por *PLC $\gamma$*  (Pleiman y col., 1994b).

Se ha demostrado la asociación de cinasas de la familia *Src* con la mIgM. La interacción de las cinasas *Lyn* y *Fyn* con la cadena  $Ig\alpha$  se da a través de los 10 residuos amino terminales de las cinasas cuando el ITAM no está fosforilado, mientras que al fosforilarse éste, la unión se lleva a cabo mediante el dominio SH2 de las cinasas (Pleiman y col., 1994b).

Otra cinasa asociada al receptor aún en células no activadas es *Syk*, la cual se presume que se asocia a la mIgM, ya que esta asociación *Syk*-mIgM se ha podido detectar en lisados de linfocitos B aún cuando se usan condiciones drásticas para lisar las células y se pierde la asociación con el heterodímero asociado a la mlg (Pleiman y col., 1994a). Dentro de la región transmembranal de la mlgM hay 2 secuencias de aminoácidos polares. La primera de ellas (TTAST), se localiza en la parte aminoterminal de la región transmembranal y contiene la información suficiente para la asociación de las cadenas  $\mu$  con  $Ig\alpha$ . Se ha visto que estos residuos son importantes en el transporte del receptor a la membrana, pero no en la transducción de señales. Por otro lado, la segunda secuencia (YSTTVT), localizada al extremo carboxilo terminal de la región transmembranal, y la cual por diversos métodos algorítmicos se predice que puede ser citoplásmica, se considera sitio potencial de interacción con *Syk* o con otras cinasas asociadas (Pleiman y col., 1994a; Pleiman y col., 1994c).

Se ha propuesto que *Syk* es la cinasa encargada de iniciar la cascada de fosforilaciones luego de la agregación. Esta propuesta se basa en las siguientes observaciones:

1) Receptores quiméricos que contienen en su porción citoplásmica la secuencia de *Syk*, inducen la fosforilación en tirosina y el incremento de iones  $Ca^{2+}$  en el citosol al ser agregados, mientras que receptores quiméricos que contienen la secuencia de *Lck* ó de *Zap-70* en su dominio citoplasmático, no lo hacen.

2) *Syk* se asocia a la mlgM en células no activadas, aún en condiciones en las cuales la asociación del heterodímero  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$  con la mlgM se pierde.

3) Se ha visto que la inactivación del gene de *Syk* da como resultado la abolición total de las señales inducidas por el BCR.

4) Las cinasas de la familia *Src* se unen a *Syk* fosforilada a través de sus dominios SH2, lo cual requiere la fosforilación previa de *Syk*.

5) Estudios recientes indican que *Syk* es activada por la agregación del TCR en una línea celular deficiente en *Lck* y esta activación ocurre en ausencia de cinasas *Src* o *Zap-70* activadas (Revisado por Pleiman y col., 1994a).

Por otro lado, se ha demostrado que *Lyn* puede fosforilar directamente y modular la actividad de *Syk*. Además, en estudios realizados con receptores quiméricos que contienen la región transmembranal de CD8 y el tallo citoplasmático de  $Ig\alpha$  o  $Ig\beta$ , la interacción con *Syk* sólo ocurre luego de la agregación del receptor, sugiriendo que la fosforilación de los residuos de tirosina del ITAM es necesaria para la interacción de *Syk* con las cadenas  $Ig\alpha$  o  $Ig\beta$ . Esta posibilidad se confirmó al usar péptidos fosforilados de los ITAMs de  $Ig\alpha$  o  $Ig\beta$  a los cuales se une *Syk* con alta afinidad (Revisado por Pleiman y col., 1994a).

Los datos anteriores sugieren que *Syk* puede actuar antes de las cinasas de la familia *Src*, al estar unida a mIg en células no activadas, y también puede ser reclutada después de la activación de *Lyn*, esto es, *Syk* puede actuar antes y después de las cinasas *Src* en la vía de activación inducida por la agregación del BCR.

Pleiman y Cambier han postulado dos distintos mecanismos de activación a través del BCR. En el primero *Syk* se encuentra unida a la mIgM y sería la primer cinasa en activarse. La activación de *Syk* permitiría la fosforilación de los residuos de tirosina de los ITAMs, el reclutamiento y activación de cinasas de la familia *Src*, *Syk* y otras moléculas efectoras. Otro modelo alternativo de activación en linfocitos B es inducido por el entrecruzamiento del BCR con anticuerpos monoclonales anti-receptor. En este modelo, la agregación del BCR daría

como resultado la activación de las cinasas de la familia *Ser* asociadas a las cadenas  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$ , mediante un mecanismo de transfosforilación. Esta vía podría ser independiente de *Syk* (Revisado por Pleiman y col., 1994a).

### 1.2.3. Receptor de alta afinidad para $IgE$ ( $Fc\epsilon R1$ ).

Generalmente se había considerado al receptor de alta afinidad para el Fc de la  $IgE$ , como exclusivo de basófilos y células cebadas, pero en los últimos años se ha detectado en células de Langerhans de individuos sanos (Wang y col., 1992; Bieber y col., 1992), así como en monocitos (Maurer y col., 1994) y eosinófilos (Revisado por Paolini y col., 1994) de individuos con dermatitis atópica. El  $Fc\epsilon R1$  es un complejo tetramérico compuesto por una cadena  $\alpha$ , una cadena  $\beta$  y un homodímero de cadenas  $\gamma$  unidas por puentes disulfuro (Paolini y col., 1994) (Figura 1). En células de Langerhans, el  $Fc\epsilon R1$  no requiere la cadena  $\beta$  para ser expresado en la membrana celular e inducir las funciones mediadas a través de éste (Bieber y col., 1994).

La cadena  $\alpha$  posee un segmento extracelular que contiene 2 dominios de  $Ig$ , el segundo de los cuales es necesario para la unión a la  $IgE$ ; contiene además 7 sitios potenciales de glicosilación en el receptor de rata y 6 en los de humano y ratón. La secuencia del ADN es 68 % homóloga entre estas especies, pero la secuencia de aminoácidos sólo es idéntica en un 38 %. Esta cadena tiene un peso molecular aparente de 45-65 kDa. Tiene una sola región transmembranal que es altamente conservada entre humano, rata y ratón (62%), especialmente 9 residuos consecutivos, 8 de los cuales se encuentran también en los receptores  $Fc\gamma RIII$  humano y murino, lo cual sugiere que estos residuos están involucrados en la interacción con las cadenas  $\gamma$  y asociadas a estos receptores. La afinidad de la cadena  $\alpha$  del receptor por la  $IgE$  es de  $10^{10} M^{-1}$  (Revisado por Ravetch y Kinetic, 1991).

La cadena  $\beta$  tiene 2 asas extracelulares, atraviesa 4 veces la membrana celular y tanto su porción amino como carboxilo terminal están situadas en el citoplasma celular. Su peso molecular aparente es de 32 kDa. El gen que codifica para la cadena  $\beta$  se localiza en el

cromosoma 19. Las secuencias del ADN y de aminoácidos entre rata y ratón tienen un porcentaje de identidad de 87 y 83 %, respectivamente, mientras que la homología en la secuencia de aminoácidos entre humano y roedor es de 70 % (Revisado por Kinet y Metzger, 1990; Ravetch y Kinet, 1991).

Las cadenas  $\gamma$  tienen una alta homología con la cadena  $\zeta$  del receptor de antígeno de células T, y al igual que ésta, también forman dímeros. El peso molecular aparente es de 7-9 kDa. Los genes que codifican para las cadenas  $\alpha$  y  $\gamma$  se localizan en la región distal del cromosoma 1. La cadena  $\gamma$  es altamente conservada entre humano, rata y ratón, con una homología del 86 % en la secuencia de aminoácidos. Datos recientes con cadenas mutadas indican que la dimerización de las cadenas ocurre a través de la cisteína amino-terminal.

El complejo tetramérico se mantiene unido por enlaces no covalentes muy lábiles al disociar la membrana celular, por lo cual es necesario el uso de detergentes muy suaves para no romper los enlaces entre las cadenas que conforman el receptor. Las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  contienen un ITAM en su porción citoplasmática (Revisado por Kinet y Metzger, 1990; Ravetch y Kinet, 1991) (Figura 2).

Uno de los primeros eventos dentro de la cascada de señalización del Fc $\epsilon$ RI es la fosforilación en residuos de tirosina de las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$ , así como de otros sustratos entre los cuales se encuentra la *PLC- $\gamma$* , el proto oncogen *vav*, *p125<sup>FAK</sup>* y *Syk* (Li y col., 1992; Hutchcroft y col., 1992; Stephan y col., 1992; Oliver y col., 1994). Además, se han detectado algunas cinasas activadas de la familia *Src*, entre las cuales se encuentran *Lyn*, *c-Src* y *Yes*, dependiendo de la línea celular que se estudie (Eiseman y col., 1992; Beaven y Metzger, 1993). Se ha visto también un incremento de la fosforilación en serina de la cadena  $\beta$  y la fosforilación en treonina de la cadena  $\gamma$  (Paolini y col., 1992), así como la activación de diversas isoenzimas de la cinasa de treonina y serina *PKC* (Revisado por Beaven y Metzger, 1993). Se ha demostrado que un 3-4 % de la cinasa de tirosina *Lyn* se asocia a la cadena  $\beta$  aún en células no activadas, y que la agregación del Fc $\epsilon$ RI hace que esta asociación se incremente de 3 a 4 veces (Yamashita y col., 1994). Ha sido demostrado también que la

cadena y promueve la activación de la cinasa *Syk* (Stephan y col., 1992; Benhamou y col., 1993; Kihara y col., 1994; Jouvin y col., 1994).

La fosforilación de *Syk* es un evento temprano que puede ser detectado 15 segundos después de la agregación del receptor. Esta fosforilación es independiente de la entrada de iones  $Ca^{2+}$  y de la activación de *PKC* ó *PLC $\gamma$ 1* (Stephan y col., 1992; Adamezewski y col., 1992; Benhamou y col., 1993). Asimismo, la activación de la *PLC $\gamma$ 1* puede ser un evento independiente de la fosforilación de *Syk*. La secreción del contenido de los gránulos preformados es dependiente de la entrada de iones de  $Ca^{2+}$  provenientes del exterior de la células (Stephan y col., 1992). Con base en estas observaciones, se ha propuesto que por lo menos dos vías de activación diferentes son disparadas por la agregación del Fc $\gamma$ RI: una vía que es independiente de la entrada de iones de  $Ca^{2+}$  y en la cual interviene *Syk* y otra vía que requiere la entrada de iones  $Ca^{2+}$  y es independiente de la fosforilación de *Syk* (Adamezewski y col., 1992; Stephan y col., 1992; Benhamou y col., 1993).

La posición relativa de *Syk* y *Lyn* en las vías de activación se ha tratado de dilucidar por diferentes métodos. Se ha visto que mediante el uso de inhibidores de cinasas de tirosina tales como herbimicina, genisteina y tirfostina se bloquean todas las respuestas celulares (June y col., 1990; Carter y col., 1991). Se ha usado también otro tipo de inhibidores como el piceatanol, el cual inhibe la fosforilación de *Syk* y otros sustratos, causando una inhibición general del metabolismo y funciones de las células cebadas. También se ha visto que algunos sustratos se fosforilan más en presencia de este inhibidor, como es el caso de *Lyn*, lo cual puede indicar: a) *Syk* está involucrada en la regulación de *Lyn*, ó b) que el inhibidor actúa sobre alguna otra cinasa que regula *Lyn* (Oliver y col., 1994). Al agregar receptores quiméricos, los cuales continen en su porción citoplasmática la secuencia de *Syk*, se induce la secreción de mediadores proinflamatorios y la activación de *Syk* sin que se necesite la presencia de *Lyn* (Eiseman y col., 1992; Jouvin y col., 1994; Rivera y col., 1995).

Los datos anteriores permiten proponer un modelo de activación del Fc $\gamma$ RI en el cual la agregación del receptor podría inducir la activación de *Lyn* unida al receptor, mediante

transfosforilación. CD45 podría estar involucrada en esta activación, defosforilando el sitio de regulación negativa de la cinasa. Al activarse, *Lyn* podría fosforilar los residuos de tirosina de los ITAMs de las cadenas  $\gamma$  y esta fosforilación ser la responsable del reclutamiento y activación de *Syk* y de otras moléculas involucradas en la señalización. Al activarse, *Syk* puede interactuar y activar otras moléculas efectoras (Paolini y col., 1994; Pribluda y col., 1994). Una vez que se lleva a cabo la activación de las respuestas efectoras, un mecanismo de control de la vía de activación (posiblemente fosfatasas) actuaría para regular la cascada de señales y permitir el desacople de los receptores (Paolini y col., 1992), llevando a la célula a un estado de desensibilización.

#### 1.2.4. Receptores para el Fc de la IgG.

Los receptores para el Fc de la IgG son expresados por una gran variedad de tipos celulares, entre los cuales se encuentran los linfocitos T activados, linfocitos B, monocitos, macrófagos, eosinófilos, plaquetas, basófilos, neutrófilos, células cebadas, células asesinas naturales (NK), etc. (Revisado por Sandor y Lynch, 1993; Keegan y Paul, 1992). Estos receptores participan en una amplia gama de funciones efectoras, tales como: fagocitosis, secreción de citocinas que regulan la proliferación de linfocitos y la producción de anticuerpos, secreción de mediadores inflamatorios, activación de la respuesta oxidativa, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, etc., (Revisado por Ravetch y Kinet, 1991; Keegan y Paul, 1992). Los receptores para IgG son un grupo heterogéneo de moléculas, clasificándose actualmente en 3 tipos, en base a su secuencia de aminoácidos y su afinidad por el ligando:  $Fc\gamma RI$ ,  $Fc\gamma RII$  y  $Fc\gamma RIII$ . Dentro de cada tipo, existen también distintas isoformas (Figura 3).

Los receptores para IgG tienen dominios extracelulares de unión al ligando estructuralmente relacionados, pero difieren en sus dominios transmembranales e intracelulares. Esto puede indicar que diferentes isoformas de  $Fc\gamma Rs$  pueden estar asociadas de manera diferente con la vía de transducción de señales dentro de la célula (Revisado por Capel y col., 1994). Cada miembro de esta familia es una glicoproteína integral de membrana, con excepción del



Fc $\gamma$ RIIB expresado en neutrófilos, el cual está anclado a la membrana por un enlace de glicosil fosfatidil inositol (GPI) (Revisado por Ravetch y Kinet, 1991).

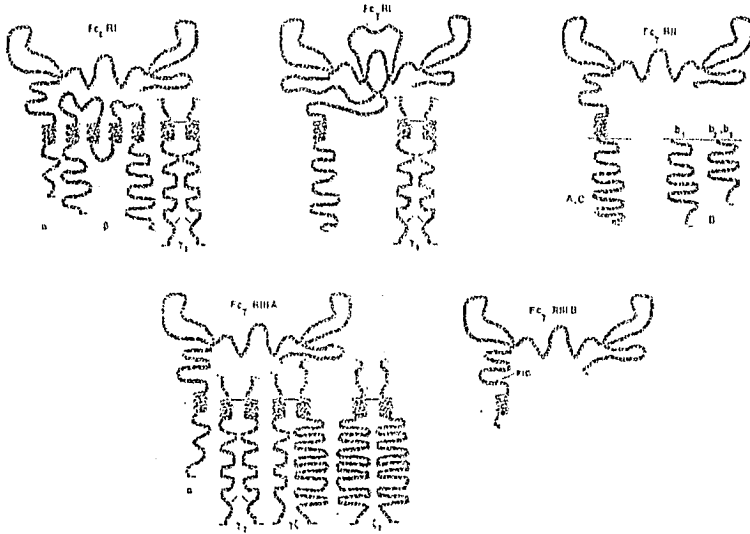


Figura 3. Receptores para la porción Fc de las Igs. Esquemas de la estructura del receptor tipo I para el Fc de la IgE (Fc $\gamma$ RI) y de los receptores para el Fc de la IgG (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, B y C, Fc $\gamma$ RIIIA y B).

#### 1.2.4.1. Receptor tipo I para el Fc de la IgG (Fc $\gamma$ RI).

Este receptor es el único al cual se une la IgG monomérica dado que su afinidad por la Ig es alta ( $K_a = 10^7 - 10^9 M^{-1}$ ). Este receptor se expresa en monocitos y macrófagos y puede ser inducido en neutrófilos por IFN- $\gamma$ . En humanos se ha designado como CD64. Está codificado por un sólo gen, ubicado en el cromosoma 1, y se han identificado 3 transcritos diferentes. En el humano tiene 6 sitios de glicosilación y 5 en el ratón, con un peso molecular aparente de 72 y 67 kDa respectivamente. Contiene en su región extracelular 3 dominios de Ig, de los cuales los 2 primeros son homólogos a los del Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII, mientras que el tercero tienen poca similitud. La presencia de este último dominio puede estar involucrada en la alta afinidad del receptor (Revisado por Ravetch y Kinet, 1991)

(Figura 3). En monocitos se ha encontrado asociado a la cadena  $\gamma$  del Fc $\gamma$ RI (Ernst y col., 1993; Scholl y col., 1993; Masuda y col., 1993).

Se ha detectado fosforilación en serina en la subunidad  $\gamma$  del Fc $\gamma$ RI, lo cual, hasta el momento, no había sido detectado en ningún otro miembro de la familia génica  $\zeta$ . Esta fosforilación en residuos de serina ocurre después que el receptor es agregado por anticuerpos anti-receptor o cuando las células son activadas con PMA, y antes que ocurra la fosforilación en tirosina, lo cual podría indicar que la fosforilación en serina esta regulando negativamente la función de la cadena  $\gamma$  y en el Fc $\gamma$ RI (Durdin y col., 1994). En estudios de transfección en células COS se demostró que el Fc $\gamma$ RI es capaz de mediar endocitosis sin que sea necesaria la presencia de la cadena  $\gamma$ , y para que se realice esta función sólo se necesita de la región extracelular del receptor. Asimismo, la vía por la cual se lleva a cabo esta función es independiente de la activación de cinasas de tirosina. Por otro lado, para que las células transfectadas lleven a cabo la fagocitosis, es necesaria la asociación con la cadena  $\gamma$  y la fosforilación en tirosina de ésta. De lo anterior se concluye que el Fc $\gamma$ RI es capaz de mediar endocitosis y fagocitosis en células transfectadas, pero estos procesos dependen de diferentes dominios del receptor y son mediados por diferentes señales intracelulares (Davis y col, 1995).

#### 1.2.4.2. Receptor tipo II para el Fc de la IgG (Fc $\gamma$ RII).

Este receptor es el de distribución más amplia, pues se encuentra en todas las células que expresan receptores para IgG, con excepción de las células NK. La afinidad por el ligando es baja (menor de  $10^7 M^{-1}$ ). El receptor murino está codificado por un gen que da origen a 2 transcritos (b1, b2), mediante el procesamiento alternativo de los exones que codifican la región citoplasmática del receptor. La forma b1 se expresa preferencialmente en linfocitos y la b2 en macrófagos. Ambas formas contienen 4 sitios de glicosilación y su peso molecular aproximado es de 40-60 kD. El Fc $\gamma$ RII en humanos está codificado por 3 genes localizados en el cromosoma 1. Se han identificado 6 transcritos diferentes que codifican para este receptor. Se le ha designado como CD32. Contiene 2 o 3 sitios de glicosilación y su peso

molecular aparente es de 40 kDa. El Fc $\gamma$ RIIA y el Fc $\gamma$ RIIC se expresan preferencialmente en macrófagos, monocitos y neutrófilos, mientras que el Fc $\gamma$ RIIB se encuentra en monocitos, macrófagos y linfocitos B (Revisado por Ravetch y Kinet, 1991). No se han detectado subunidades asociadas al Fc $\gamma$ RII. El tallo citoplasmático de la cadena de unión al ligando de los Fc $\gamma$ RII A y C contienen la secuencia consenso encontrada en los otros receptores, pero a diferencia de ellos, en el tipo IIA y II C hay 12 aminoácidos separando la I/L de la segunda Y, en lugar de 7 (Revisado por Santana y col., 1996) (Figura 3). Los Fc $\gamma$ RIIB sólo contienen parte de la secuencia (YxxI/L). A esta última se le ha denominado ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif), ya que se ha visto involucrada en la regulación negativa del receptor de antígeno de linfocitos B (D'Ambrosio y col., 1995).

Entre las proteínas fosforiladas y cinasas activadas que se asocian al receptor luego de su agregación se han encontrado a *Fgr* (Hamada y col., 1993), *Lyn* y *Hck* (Ghazizadeh y col., 1994), *PLC $\gamma$  1* (Liao y col., 1992), *PLC $\gamma$  2*, *GAP*, *Fav* (Kiener y col., 1993), *Shc* (Shen y col., 1994) y *Syk* (Agarwal y col., 1993).

#### 1.2.4.3. Receptor tipo III para el Fc de la IgG (Fc $\gamma$ RIII).

El receptor murino Fc $\gamma$ RIII está codificado por un sólo gen, ubicado en el cromosoma I, y da origen a un sólo transcrito. Su afinidad por el ligando es baja, igual a la del tipo II (Revisado por Ravetch y Kinet, 1991). Se le ha visto asociado con cadenas  $\gamma$  o  $\zeta$  (Ra y col., 1989), las cuales le permiten expresarse en la membrana; y existe un reporte de que se ha encontrado asociado con la cadena  $\beta$  del Fc $\epsilon$ RI (Kurosaki y col., 1992). Su distribución está restringida a macrófagos y líneas celulares de macrófagos, células NK, células precursoras mieloides y líneas celulares de neutrófilos. En el sistema humano se han encontrado 2 formas distintas: Fc $\gamma$ RIIIA y Fc $\gamma$ RIIIB, productos de 2 genes distintos. El primero es una proteína transmembranal que se asocia a la cadena  $\gamma$  o  $\zeta$  (Figuras 1 y 2), mientras que el segundo se encuentra anclado a la membrana celular por medio de un enlace glucosídico a fosfatidil inositol (GPI) y no se han encontrado cadenas asociadas a él (Figura 3). Esto trae como consecuencia diferencias funcionales entre ambos receptores, ya que el tipo A puede mediar

citotoxicidad dependiente de anticuerpos y fagocitosis, y el tipo B no (Revisado por Ravetch y Kinet, 1991). A este receptor se le designó como CD16.

Después de la agregación del Fc $\gamma$ R1IIIA se han detectado varias proteínas fosforiladas, entre ellas *Lck* (Pignata y col., 1993; Cone y col., 1993), *PLC $\gamma$ 1* (Azzoni y col., 1992; Liao y col. 1993), *Syk* (Greenberg y col., 1994; Ting y col., 1995), *Fav* y *GAP* (Darby y col., 1994).

#### 1.2.5. Similitudes entre MIRRs.

De lo que se ha descrito sobre los receptores multicadena de reconocimiento inmune, es evidente que existen entre ellos una serie de similitudes a nivel estructural y en las vías bioquímicas que llevan a la activación celular.

##### 1.2.5.1. Similitudes estructurales.

Los MIRRs consisten de la(s) cadena(s) que se une(n) al antígeno o a la porción Fc de las Igs, y de las cadenas asociadas a ésta(s). La porción extracelular de la cadena que reconoce al ligando pertenece a la superfamilia de las Igs, al igual que varias de las cadenas asociadas (Revisado por Sandor y Lynch, 1993; Keegan y Paul, 1992).

La cadena  $\gamma$  del Fc $\epsilon$ R1 tiene un 55 % de identidad en aminoácidos con la cadena  $\zeta$  del TCR y se ha propuesto que este par de cadenas, junto con la cadena  $\eta$ , forman parte de una misma familia génica. Los genes que codifican para estas 3 cadenas en el humano y en el ratón se han encontrado como un grupo en el cromosoma 1. Se ha observado que las cadenas  $\gamma$  del Fc $\epsilon$ R1 pueden remplazar las cadenas  $\zeta$  del TCR y pueden asociarse con el complejo TCR-CD3; asimismo, se ha encontrado que las cadenas  $\zeta$  del TCR pueden sustituir a las cadenas  $\gamma$  y asociarse con el Fc $\epsilon$ R1. Estudios de transfección en células COS han establecido que el Fc $\epsilon$ R1, el Fc $\gamma$ R1IIIA y el TCR se expresan en membrana celular sólo si un miembro de la familia génica  $\zeta$  está presente, asociado al MIRR. También en estudios de transfección se ha

visto que la Ig $\alpha$  es necesaria para que la mlg se exprese en membrana (Revisado por Keegan y Paul, 1992; Pleiman y col., 1994a; Lin y col., 1992).

Una característica de gran importancia funcional, es la presencia, en varias cadenas, de un dominio llamado ITAM, el cual se localiza en la porción intracelular de las cadenas Ig $\alpha$  e Ig $\beta$  del BCR;  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  del CD3;  $\gamma$  del Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\epsilon$ RI, además de la cadena  $\beta$  de éste último; así como  $\zeta$  y  $\eta$  del TCR (Figura 2). Este motivo está formado por 18 aminoácidos que tienen la siguiente secuencia consenso: D/E XXVXXL/XXXXXXXXXXVXXL/I. Existen distintas evidencias de que la fosforilación de las tirosinas del motivo es importante para la transducción de señales de activación celular. (Revisado por Keegan y Paul, 1992; Sandor y Lynch, 1993).

#### 1.2.5.2. Similitudes en las vías de activación.

Existen también semejanzas notables en el mecanismo y las vías bioquímicas de activación mediadas por los MIRR. Entre ellas está la necesidad de la agregación de los receptores para que se dé la activación celular. El entrecruzamiento de los MIRR inicia una serie de procesos bioquímicos al interior de la célula, tales como la hidrólisis de fosfolípidos de inositol, la cual genera el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). Este último es el responsable de la liberación de iones Ca $^{2+}$  de las pozas internas. El DAG es un cofactor para la activación de la PKC, una importante cinasa específica para residuos de treonina y serina. Se ha visto también una elevación de la concentración citoplasmática de iones Ca $^{2+}$ , debido a la liberación del calcio de las pozas internas y a la entrada de calcio extracelular. Uno de los primeros eventos que ocurren luego de la agregación de los receptores es la activación de cinasas de tirosina de la familia *Src* o *Zap70/Syk*, las cuales fosforilan al receptor y a una serie de sustratos que van a participar en la activación celular.

### 1.3. Células cebadas.

Las células cebadas o mastocitos son granulocitos que se clasifican en células cebadas de tejido conectivo y células cebadas de mucosas. La contraparte sanguínea de estas células son los basófilos. La primera evidencia de la heterogeneidad de las células cebadas fue la diferencia en los patrones de tinción histoquímica, los cuales demostraron que las células cebadas de mucosa (CCM) muestran incorporación del colorante azul alciano, mientras que las células cebadas de tejido conectivo (CCTC) incorporan safranina. Otra de las diferencias es que las CCM son más pequeñas, contienen menos gránulos y el contenido de éstos es más heterogéneo. Los gránulos de secreción de las CCTC contienen heparina, grandes cantidades de histamina, proteasa I, triptasa y carboxipeptidasa A; además estas células generan PGD<sub>2</sub> como producto exclusivo del metabolismo del ácido araquidónico. Las CCM contienen menor cantidad de histamina, contienen proteasa II, y metabolizan el ácido araquidónico mediante las vías de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa para generar LTC<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub> y PGD<sub>2</sub> (Revisado por Gurish y Austen, 1989).

Las células cebadas contienen en sus gránulos de secreción y sintetizan *de novo* diversos mediadores proinflamatorios y vasoactivos entre los cuales se encuentran: (Revisado por Gurish y Austen, 1989; McKay y col., 1994)

- a) Aminas biogénicas: histamina y serotonina.
- b) Citocinas: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, LIF, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$ .
- c) Proteoglicanos: condroitin sulfato glicosaminoglicano y heparina.
- d) Enzimas: hidrolasas ácidas, quimasa, fosfolipasas, proteasa I, proteasa II, triptasa, carboxipeptidasa A.
- e) Nucleótidos: adenosina.
- f) Neuropeptidos: péptido vasoactivo intestinal (VIP).
- g) Metabolitos reactivos del nitrógeno: óxido nítrico (NO).
- h) Derivados del ácido araquidónico: leucotrienos y prostaglandinas.

Tanto las células cebadas como los basófilos expresan FcεRI. Dada la alta afinidad de éste receptor por IgE, *in vivo* la IgE se encuentra unida a los receptores celulares. La agregación de éstos complejos IgE-receptor por el alérgeno, es el evento desencadenante de las respuestas alérgicas, ya que esta agregación da como resultado la liberación del contenido de los gránulos preformados y la síntesis *de novo* de derivados del ácido araquidónico (Revisado por Gurish y Austen, 1989).

La línea celular RBL-2H3 obtenida de basófilos de rata leucémica (Barsamian y col., 1981) expresa en membrana receptores de alta afinidad para IgE y receptores para IgG, por lo cual provee un modelo donde se puede estudiar comparativamente la transducción de señales mediadas a través de ambos receptores para Fc en células cebadas.

#### 1.4. Justificación.

Uno de los receptores multicadena de reconocimiento inmune que más se ha estudiado es el FcεRI, y algunos de los datos obtenidos han servido de paradigma para el estudio de las vías bioquímicas involucradas en la activación celular a través de los MIRRs. Los receptores Fcγ, en contraste, no han sido tan estudiados, en parte por la dificultad que implica el poder distinguir un subtipo del otro.

El receptor de alta afinidad para IgE y los receptores para IgG se asocian a las cadena γ, la cual juega un papel principal en la transducción de señales a través de estos receptores. Asimismo, se ha visto que las vías de activación inducidas por cada uno de estos receptores en modelos celulares diferentes, son similares.

Todo esto hace interesante el estudio de la activación mediada a través de cada uno de estos receptores en una célula que exprese ambos receptores en membrana, como es la línea celular RBL-2H3. Estos estudios pueden aportarnos datos acerca de si ambos receptores están acoplados a una misma vía de señalización, y de ser así, si un receptor puede modular la señalización del otro.

### **1.5. Objetivo principal.**

Estudiar comparativamente las vías bioquímicas y respuestas celulares inducidas a través de receptores Fc $\gamma$  y receptores Fc $\epsilon$  tipo I en un modelo celular que expresa nativamente ambos tipos de receptores.

#### **1.5.1. Objetivos particulares.**

1. Estudiar cuál IgG murina se une a los receptores Fc $\gamma$  de células cebadas de la línea celular RBL-2H3.

2. Activar las células cebadas a través de sus receptores Fc $\gamma$  y ver si la activación está mediada por estos receptores, comparándola con la activación mediada por los receptores Fc $\epsilon$ .

3. Estudiar las vías bioquímicas de activación inducidas por la estimulación de los Fc $\gamma$ R y los Fc $\epsilon$ RI, en células RBL-2H3.



## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

#### Anticuerpos

IgE anti-DNP: SPE7 y B4

IgG2b anti- Fc $\epsilon$ RI: H10

IgG anti-DNP

IgG1: 2C5, 2C8 y 3E9

IgG2a: 2C3 y 3G10

IgG2b: 3B5 y 4F8

Anti-Ig de ratón acoplado a fluoresceína: FITC-cabra-anti- Ig de ratón.

Anti-Ig de ratón acoplado a fosfatasa alcalina.

El anticuerpo SPE7 se obtuvo de un hibridoma comprado a la ATCC. Este anticuerpo se purificó a partir de líquido de ascitis mediante precipitación con sulfato de amonio, seguido de cromatografía de afinidad en columnas de DNP-Sefarosa. Los anticuerpos H10 y B4 fueron obtenidos y purificados por el Dr. Ortega, en el laboratorio del Dr. Pecht, Weizman Institute of Science, Israel. Estos anticuerpos se purificaron por cromatografía de afinidad. Los anticuerpos IgG anti-DNP fueron obtenidos y purificados por la Q.F.B. Claudia Garay, en el laboratorio del Dr. Ortega, IIB, UNAM, México. Fueron purificados por cromatografía de afinidad. El anticuerpo FITC-Goat- $\alpha$ -Mouse IgG y el conjugado anti-Ig de ratón acoplado a fosfatasa alcalina se compraron a Zymed.

#### Cultivos celulares

Las células cebadas de la línea celular RBL-2H3 fueron cultivadas en medio MEM suplementado con 2mM de glutamina, 1000 U/ml de Penicilina G, 0.01 mg/ml de

estreptomicina y 10 % de suero fetal bovino inactivado. Se mantuvieron en una atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### ELISA anti-DNP

Para verificar la unión del anticuerpo a las placas que se usaron en los ensayos de secreción en fase sólida, se llevó a cabo un ensayo de ELISA. Para esto, se sensibilizan placas de ELISA de 96 pozos con BSA y luego con ácido trinitro-benceno-sulfónico (TNBS), según se describe más adelante. Después de bloquear los sitios no específicos con BSA al 1 %, se agregan 100 µl/pozo del primer anticuerpo ( Ig anti- DNP) y se incuba 2 hr a 37°C para permitir la unión del anticuerpo al antígeno. Se lavan las placas 3 veces con PBS para eliminar el anticuerpo que no se unió y se adicionan 100 µl/pozo del segundo anticuerpo anti-Ig de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (Zymed), dilución 1:1000 en PBS-BSA al 1 %. Se incuba durante 2 hr a 37°C para permitir la unión del segundo anticuerpo al primer anticuerpo y se lava 3 veces con PBS para eliminar el anticuerpo no unido. Una vez hecho esto se agregan 100 µl/pozo del sustrato de fosfatasa alcalina (p-nitrofenil fosfato disódico en amortiguador de dietanolamina) y se incuba a temperatura ambiente hasta observar buen color (aproximadamente 10-15 minutos). La reacción se detiene adicionando 50 µl/pozo de NaOH 2 N y se obtienen las lecturas de absorbancia a 405 nm, en el lector de placas de Elisa (Microplate Reader).

### Fagocitosis (Evaluación microscópica)

El ensayo se lleva a cabo de la siguiente manera: Se siembran 5 X 10<sup>4</sup> células/50 µl de MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino, glutamina y una mezcla de antibióticos (ver apéndice II), sobre un cubreobjeto. Se incuba 2 hr a 37°C en atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>. Los eritrocitos de carnero son opsonizados con las diferentes subclases de IgG ó IgE, se resuspenden en MEM complementado, quedando a una concentración del 1 % v/v,

y se adicionan 50 µl de esta suspensión a las células. Para que se lleve a cabo la fagocitosis se incuban las preparaciones durante 3 hr a 37°C y luego de esto se lisan los eritrocitos no fagocitados mediante la adición de NH<sub>4</sub>Cl 0.08 M. Las preparaciones se lavan con PBS hasta retirar toda la hemoglobina proveniente de la lisis de los glóbulos rojos, y se adiciona paraformaldehído al 1 % para fijar las células. Se montan las preparaciones sobre un portaobjetos con 10 % de glicerina y se observa al microscopio. Se reporta el número de células con 1 o más eritrocitos fagocitados de un total de 100 células y la cantidad total de eritrocitos ingeridos por las células que fagocitaron.

### **Fagocitosis (Técnica de Diamino bencidina)**

Como la evaluación microscópica de la fagocitosis resulta muy laboriosa y tardada, por la cantidad de células que es necesario contar individualmente, así como la cantidad de muestras que se tienen que manejar, se estandarizó en el laboratorio una técnica colorimétrica para cuantificar la fagocitosis, basada en el método de Jungi (1985). Esta técnica se basa en la actividad de pseudoperoxidasa que posee la hemoglobina, la cual desarrolla un compuesto colorido en presencia de diaminobencidina (DAB) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Esta reacción colorida puede ser cuantificada espectrofotométricamente, en un lector de ELISA, lo cual permite realizar microensayos en los cuales se pueden manejar un gran número de condiciones al mismo tiempo.

Se siembran  $5 \times 10^4$  células/pozo en una placa de cultivo de 96 pozos, y se incuban en atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 hr. Las monocapas se lavan 2 veces con solución de trabajo Tyrode, se agregan 50 µl por pozo de esta misma solución y 50 µl de eritrocitos al 2 % opsonizados según el protocolo. Para tener un control positivo de activación celular se cuantifica la secreción de mediadores proinflamatorios, para la cual se incuban las células durante 1 hr a 37°C, se toma una alícuota de 20 µl de cada muestra y se coloca en una placa de 96 pozos limpia para cuantificar la secreción de la enzima β-hexosaminidasa. La placa con las células se incuban otras 2 hr a 37°C, y los eritrocitos no

ingeridos son lisados mediante la adición de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.08 M. Las monocapas son lavadas 4 veces con PBS para eliminar la hemoglobina. A continuación se lisan las células con SDS al 0.3 % (100  $\mu\text{l}$ / pozo) y se adicionan 200  $\mu\text{l}$ / pozo del sustrato de DAB (8 mg de DAB, 240  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en 20 ml de PBS). Una vez que se ha desarrollado la coloración suficiente, se determina la absorbancia a 490 nm en el lector de Elisa (Microplate Reader).

#### **Formación de Rosetas (Evaluación microscópica)**

Para determinar si existe unión de las diferentes subclases de IgG murina a las células cebadas de rata, se realizaron ensayos de formación de rosetas, considerando como roseta la célula cebada que tenga unidos 3 o más eritrocitos de carnero opsonizados con la IgG o IgE murina.

El protocolo es el siguiente: Se siembran sobre un portaobjetos  $5 \times 10^4$  células / 50  $\mu\text{l}$  de MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino. Se incuban 2 hr a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera húmeda con 5 % de  $\text{CO}_2$  para permitir la adherencia de las células. Se adicionan 50  $\mu\text{l}$  de eritrocitos opsonizados y se incuba 1 hr a  $4^\circ\text{C}$ , para permitir la unión, pero no la ingestión de los eritrocitos. Se lavan las muestras con solución de trabajo Tyrode para eliminar los eritrocitos que no están unidos a las células, y se procede a observar las preparaciones al microscopio, expresando los resultados como el número de células que forman rosetas por cada 100 células.

#### **Formación de Rosetas (Técnica de la DAB)**

Como método alternativo para cuantificar la unión de los eritrocitos opsonizados con las diferentes subclases de anticuerpos murinos a las células RBL-2H3, se utilizó una técnica colorimétrica basada en el método de Jungi, similar a la descrita arriba en el protocolo de

fagocitosis (técnica de la DAB). Esta técnica nos permite realizar ensayos con una gran variedad de condiciones al mismo tiempo.

Se siembran  $5 \times 10^4$  células/pozo en una placa de 96 pozos, incubando 24 hr a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera húmeda con 5 % de  $\text{CO}_2$ . Se lavan las células 2 veces con Tyrode, se adicionan 50  $\mu\text{l}$ /pozo de esta misma solución y 50  $\mu\text{l}$  de eritrocitos opsonizados según el protocolo. Se incuba durante 1 hr a  $4^\circ\text{C}$  para evitar la ingestión de los GRC opsonizados. Se lava 4 veces con Tyrode para eliminar los eritrocitos que no están unidos a las células. A continuación se procede a lisar las células con SDS al 0.3 % (100  $\mu\text{l}$ / pozo) y se adicionan 200  $\mu\text{l}$ / pozo del sustrato de DAB (como se explica arriba), esperando a que se desarrolle el color. Se determina la absorbancia a 490 nm. Los resultados son expresados en densidad óptica.

#### **Inhibición del pegado de $^{125}\text{I}$ -IgE a células RBL-2H3**

Para tener la certeza de que los estímulos aplicados a las células RBL-2H3 son a través del  $\text{Fc}\gamma\text{R}$ , se necesitan células que tengan disponible solamente dicho receptor, por lo cual se procedió a buscar la manera de bloquear al receptor de alta afinidad para IgE. Para verificar si el  $\text{Fc}\epsilon\text{R1}$  estaba bloqueado, se realizaron ensayos de inhibición de la unión de  $^{125}\text{I}$ -IgE a las células RBL-2H3.

Se colocan  $4 \times 10^6$  células/2 ml de MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino, glutamina 2 mM y una mezcla de antibióticos (ver apéndice II), en tubos para contar radioactividad, y se adicionan los anticuerpos bloqueadores a las concentraciones indicadas. Se incuba durante 2 hr, agitando ocasionalmente las muestras. Se centrifuga a 1500 rpm/5 min., descartando el sobrenadante, se adicionan a continuación 50  $\mu\text{l}$  de una solución de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de  $^{125}\text{I}$ -IgE, añadiendo 350  $\mu\text{l}$  de MEM a cada muestra. Se procede a incubar las muestras 4 hr/ $4^\circ\text{C}$ . Por otro lado, se colocan 150  $\mu\text{l}$  de suero de caballo en tubos eppendorf de 500  $\mu\text{l}$ , por triplicado. Se resuspenden las células y se toman 3 alícuotas de 100  $\mu\text{l}$ ,

agregándolas a los eppendorff con suero. Otros 50  $\mu$ l de la suspensión de células se colocan en un eppendorff limpio para cuenta total. Se centrifugan las muestra 5 min. a velocidad máxima en la microfuga. Se corta la punta del eppendorff conteniendo el botón celular y se coloca en tubos para cuantificar la radioactividad en un contador de rayos  $\gamma$ . Se hacen los cálculos de cpm unidas a las células.

### Immunofluorescencia indirecta

Se ha demostrado que los anticuerpos pueden ser acoplados con  $\beta$ -antraceno o isotiocianato de fluoresceína, reteniendo la propiedad de unirse al antígeno, por lo cual estos anticuerpos fluorescentes pueden ser utilizados como reactivos muy sensibles para detectar y localizar antígenos. La inmunofluorescencia está basada en la propiedad de ciertas moléculas, llamadas fluorocromos, de que al absorber la luz, la energía de los fotones puede ser transferida a los electrones, los cuales asumen un alto nivel de energía. Parte de esta energía es liberada como calor luego de  $10^{-13}$  segundos, cuando el electrón retorna a la más baja energía vibratoria del estado excitado. La energía remanente es liberada unos nanosegundos después, como un fotón de más baja energía que el fotón inicial; a esta luz emitida se le llama fluorescencia (Goding, 1983).

Se incuba 1 ml de PBS-BSA 0.1 % en tubos eppendorf por 30 min a 37°C. Se colectan células RBL-2H3 y se resuspenden en MEM suplementado a una concentración de  $2 \times 10^6$  células /ml. Se lavan con solución de trabajo Tyrode fría, centrifugando 5 seg en la microfuga. Se añaden 0.3 ml de anticuerpo primario, diluido en solución de trabajo Tyrode. Se dejan 3 muestras sin anticuerpo primario para usar como controles. Se incuba 1 hr a 4°C, invirtiendo los tubos ocasionalmente, para resuspender las células. Se lava 2 veces con 1 ml de PBS-BSA-Azida frío. Se añade a continuación 100  $\mu$ g de anticuerpo antireceptor-fluoresceinado (FITC-H10) a uno de los tubos controles, se deja otro de los controles sin segundo anticuerpo, como control de células sin tratar. Por último, al tubo control restante y

a los tubos a los que se les adicionó anticuerpo primario se les agrega 0.3 ml de anticuerpo secundario (FITC-Goat- $\alpha$ -Mouse IgG), en dilución 1:50 en PBS-BSA-Azida. Se incuba 1 hr a 4°C, tapando las muestras de la luz, y resuspendiendo las células de vez en cuando. Se lava 2 veces con PBS-BSA-Azida frío y se fijan las muestras con 0.3 ml de PFA 1 %, durante 30 min a temperatura ambiente, cubriendo las muestras de la luz. Se lavan las muestras 2 veces con PBS y se resuspenden en 1ml de PBS (sin BSA), transfiriendo las muestras a tubos FALCON apropiados para el Fluorocitómetro (FACScan), en el cual son leídas.

#### **Radioiodinación de proteína por el método de cloramina T.**

Se prepara una columna de Sephadex G25 fine y se bloquea el pegado inespecifico adicionando 10 ml de BSA al 1 % en PBS, lavando a continuación con 30 ml de PBS. La proteína a marcar se coloca en un tubo eppendorf limpio, añadiendo PBS 20X para que la muestra esté en un medio salino alcalino apto para que se lleve a cabo la reacción de radioiodinación. Se adicionan 0.5 mCi de  $^{125}\text{I}$  y 10  $\mu\text{l}$  de una solución de cloramina T (1 mg/ml) para iniciar la reacción. Se incuba 2 minutos y se adicionan 10  $\mu\text{l}$  de bisulfito de sodio (1 mg/ml) para detener la reacción. Se coloca la muestra en la columna y se agrega PBS para eluir la muestra y permitir la separación de la proteína marcada del  $^{125}\text{I}$  libre.

#### **Secreción de $\beta$ -hexosaminidasa**

Existen diversas metodologías por medio de las cuales se puede determinar cuantitativamente la activación producida al estimular las células cebadas mediante los receptores Fc $\epsilon$ RI. Algunos de los métodos más usados se basan en la degranulación de los mediadores proinflamatorios contenidos en los gránulos de secreción. Específicamente en este trabajo, se usó la cuantificación de la actividad de la enzima  $\beta$ -hexosaminidasa en el

sobrenadante de las células RBL-2H3, siguiendo el protocolo descrito por Ortega y col. (1991).

Se colocan  $5 \times 10^4$  células en 200  $\mu$ l de medio en cada pozo de una placa de cultivo de 96 pozos y se incuba en atmósfera húmeda con 5 % de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 24 hr. Se lavan las monocapas 3 veces con solución de trabajo Tyrode, con el mayor cuidado posible para evitar que se desprendan las células. Se adicionan a continuación los estímulos indicados para el experimento, diluidos en solución de trabajo Tyrode y se incuban a  $37^\circ\text{C}$  por el tiempo indicado. Para cuantificar la actividad enzimática de la  $\beta$ -hexosaminidasa se toman alícuotas de 20  $\mu$ l de los sobrenadantes y se colocan en una placa de 96 pozos limpia, donde se les adicionan 50  $\mu$ l del sustrato ( p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida en citrato 0.1 M, pH 4.5). La mezcla enzimática se incuba durante 90 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y la reacción se detiene mediante la adición de glicina 0.2 M pH 10.7 (150  $\mu$ l por pozo). La hidrólisis del sustrato da como resultado la formación de p-nitrofenolato, el cual se cuantifica en el Microplate Reader a una longitud de onda de 405 nm. Para evaluar el contenido total de enzima, las células de algunos pozos son lisadas con Tritón X-100 al 0.5 % y las alícuotas de este lisado se tratan igual que las muestras. Los resultados son expresados como el % neto del total de  $\beta$ -hexosaminidasa presente en las células.

#### **Secreción en fase sólida mediada a través del Fc $\epsilon$ RI**

Un método alternativo de estimular células a través de receptores para inmunoglobulina es el presentar los anticuerpos unidos a una fase sólida a través de sus Fab, quedando expuesta la porción Fc, lo cual permite la agregación de receptores, sin permitirles el movimiento a través de la membrana celular.

A una placa de ELISA previamente sensibilizada con BSA-DNP se le retira el sobrenadante, se adicionan 100  $\mu$ l/pozo de los anticuerpos anti-DNP a las concentraciones previamente



establecidas (diluidos en PBS-BSA al 1 %), incubando 2 hr a 37°C. Se lava 3 veces con PBS. Se agregan las células resuspendidas en 100 µl/ pozo de Tyrode, a una concentración de  $1 \times 10^6$  células / ml, y se incuban a 37°C el tiempo indicado en cada experimento. Se toman alíquotas de 20 µl del sobrenadante para cuantificar la actividad de β-hexosaminidasa, como se detalló arriba.

### **Sensibilización de placas de ELISA (sistema DNP-anti DNP)**

Para realizar los ensayos de secreción en fase sólida, asegurándonos de que los anticuerpos queden pegados a la placa de ELISA exponiendo su región Fc, es necesario unir previamente a la placa el DNP que reconocen los anticuerpos. De esta manera, los anticuerpos quedan unidos por el Fab al hapteno, permitiendo que el Fc quede libre y pueda interactuar con el receptor para el Fc de las células cebadas. Como el hapteno no tiene la capacidad de unirse a las placas de ELISA, es necesario recubrir éstas con una proteína, la cual es nitrofenilada en sus grupos amino libres.

Como primer paso se adicionan a placas de fondo plano para ELISA (high binding) 100 µl/pozo de BSA al 1 % en amortiguador de Tris - HCl 0.125 M, pH 9.5. A continuación se incuba durante 2 hr a 37°C, para permitir la unión de la proteína a la placa. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se lavan las placas 2 veces con PBS para eliminar la proteína que no se unió a la placa, y una vez con amortiguador de boratos (ácido bórico 0.2 M, NaCl 0.15 M, pH 8.5) para proporcionar las condiciones requeridas para que se lleve a la reacción de nitrofenilación. Se adicionan 100 µl/pozo de ácido trinitro-bencen-sulfónico (TNBS) 1 mM en buffer de boratos para unir los grupos trinitrofenol (TNP) a la albúmina. Las placas de Elisa se sensibilizan con Trinitrofenol (TNP) y no con Dinitrofenol (DNP), porque los anticuerpos anti-DNP reconocen también el TNP y con este último se obtiene un título mayor de anticuerpo unido a la placa. A continuación se incuban las placas durante 1 hr a 37°C. Se eliminan los grupos sulfónicos liberados en la reacción anterior, así como el

TNBS que no alcanzó a reaccionar mediante 3 lavados con PBS. Por último, se procede a bloquear los sitios de unión inespecífica, adicionando 200  $\mu$ l por pozo de BSA al 1 % en PBS. Se incuba a 4°C durante la noche.

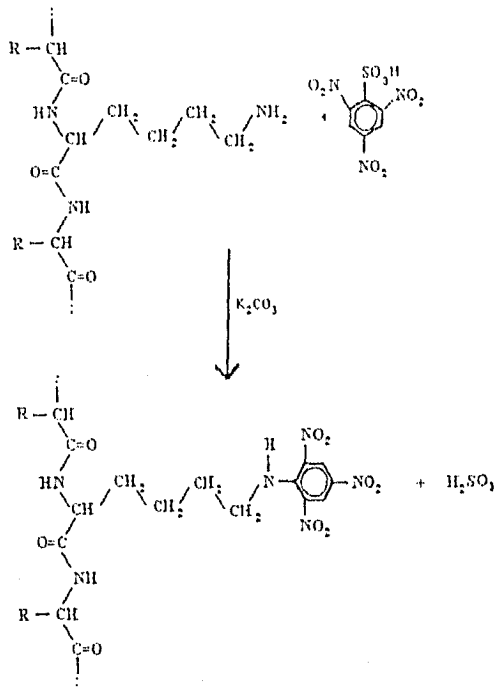


Fig. 4. Reacción de trinitrofenilación de proteínas. El ácido 2,4, 6-trinitrobenzensulfónico reacciona con el grupo  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina de la proteína, liberándose ácido sulfónico, y quedando unido a las proteínas el grupo trinitrofenol (TNP).

### Sensibilización de eritrocitos

Para marcar las proteínas de membrana de los eritrocitos con el hapteno TNP (ver arriba), se hacen reaccionar los grupos aminos libres de las proteínas con el TNBS en condiciones ligeramente alcalinas. En la reacción se libera un grupo sulfónico, quedando el hapteno TNP

unido covalentemente a las proteínas membranales del eritrocito. Debido a que los anticuerpos dirigidos contra el hapteno 2,4-dinitrofenol (DNP), tienen reacción cruzada con el hapteno 2,4,6,-trinitrofenol, éste último puede ser usado para crear grupos reactivos en la membrana de los eritrocitos (sensibilización) que permitan opsonizar éstos con anticuerpos anti-DNP. Las condiciones de sensibilización establecidas por la Bióloga Isabel Pérez en el laboratorio del Dr. Ortega, las cuales permiten una opsonización adecuada para la ingestión y que no permiten la unión y la ingestión de eritrocitos sensibilizados pero no opsonizados, son las siguientes:

Se toman 20 ml de eritrocitos de carnero (Erikar, S.A) en solución de Alsevers, y se lavan por centrifugación con amortiguador de dextrosa, gelatina y veronal (DGVB) hasta que el sobrenadante sea transparente, indicando que los eritrocitos de carnero ya no se lisan. La gelatina que contiene el DGVB impide que los eritrocitos se peguen al tubo y la dextrosa permite su sobrevivencia al proporcionar energía para sus procesos metabólicos. A continuación se lava el paquete celular con amortiguador de boratos 0.2 M- NaCl 0.15 M pH 8.5, eliminándose el sobrenadante. Se adicionan 6.22 mg de TNBS disueltos en 7 ml de amortiguador de boratos por cada ml de botón de eritrocitos. Se incuba la mezcla protegiéndola de la luz durante 15 minutos, a temperatura ambiente con agitación suave y constante. A continuación se lavan los GRC 2 veces con amortiguador de boratos y una vez con DGVB, resuspendiendo los eritrocitos a una concentración del 2 % en DGVB. Se adiciona azida de sodio al 0.02 % como conservador y se mantiene la suspensión celular hasta una semana a 4°C.

#### **Titulación de los anticuerpos anti-DNP (Hemaglutinación)**

Se titulan los anticuerpos murinos anti-DNP por el método de hemaglutinación, el cual consiste en hacer diluciones seriadas de los anticuerpos en pozos de fondo en V para microtitulación. Se colocan 25 µl/ pozo de DGVB y 25 µl de anticuerpo, quedando una dilución 1:2 en el primer pozo. Se hacen diluciones sucesivas 1:2. Se añaden 25 µl de una

suspensión al 2 % de GRC sensibilizados. Se mezcla cuidadosamente y se deja sedimentar. La aglutinación de los GRC sensibilizados indica la presencia de una concentración de anticuerpo lo suficientemente alta para permitir la formación de una malla, la cual se precipitará visiblemente. Cuando la concentración de anticuerpo en los pozos es menor a la hemaglutinante, se formará un botón compacto de GRC en el fondo del pozo. Una vez que se ha detectado la dilución a la cual ya no se forma malla (título de hemaglutinación), se opsonizan los GRC con los diferentes anticuerpos murinos, tomando como título de opsonización dos concentraciones más altas del título de hemaglutinación. Esta dilución se escogió para realizar los experimentos, ya que en ensayos previos se observó que con estas diluciones de GRC opsonizados la fagocitosis era más alta, siendo menor tanto a diluciones mayores y menores que esta. Se procede a mezclar los anticuerpos con los GRC, incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. Se lava 3 veces con solución de trabajo Tyrode y se resuspenden en esta misma solución a una concentración del 1%.

## CAPITULO 3

### RESULTADOS

Nuestro primer objetivo fue demostrar que los anticuerpos de ratón se unen específicamente a los receptores Fc $\gamma$  sobre células de rata de la línea RBL-2H3. Para verificarlo, se realizaron ensayos de formación de rosetas con eritrocitos de carnero sensibilizados con TNP (es cual también es reconocido por los anticuerpos anti-DNP) y opsonizados con anticuerpos de distinto isotipo. Los resultados de este ensayo muestran que las células RBL-2H3 forman rosetas con los eritrocitos opsonizados con los diferentes anticuerpos murinos utilizados (Tabla 1).

Anticuerpo	Isotipo	% Rosetas
Control	•	3
B4	IgE	20
2C5	IgG1	100
2C8	IgG1	100
3E9	IgG1	100
2C3	IgG2a	28
3G10	IgG2a	100
3B5	IgG2b	100
4F8	IgG2b	100

Tabla 1. Formación de rosetas entre células RBL-2H3 y eritrocitos opsonizados con diferentes subclases de anticuerpos murinos anti-DNP. Eritrocitos de carnero opsonizados con diferentes subclases de IgG murina, se adicionan a células RBL-2H3 previamente adheridas a cubreobjetos. Se incuban a 4°C durante 1 hr y se lava exhaustivamente para eliminar los eritrocitos no unidos. El porcentaje de células que forman rosetas se determinó microscópicamente. Como controles negativos se utilizaron eritrocitos no opsonizados. Se comaron 200 células por muestra y se calculó el porcentaje de células que formaron rosetas. Se consideró como roseta aquella célula con más de 4 eritrocitos adheridos.

También se comprobó la unión de los anticuerpos a la células por medio de un ensayo de inmunofluorescencia indirecta, la cual fue evaluada por citofluorometría (FACS). El 99 % de las células unen IgE, así como el anticuerpo anti-FcεRI (H10). Asimismo, más del 50 % de las células unen IgG2a e IgG2b, mientras que menos del 10 % de las células unen IgG1. La unión de los anticuerpos a las células se incrementa al adicionar los anticuerpos en forma de complejos antígeno-anticuerpo, adicionando DNP-BSA al anticuerpo primario (Tabla II).

Anticuerpo	% células que unen el	
	Ac. soluble	complejo Ag-Ac.
Control sin anticuerpo	2.9	-
Control 2 <sup>o</sup> . Ac.	2.73	-
FITC-H10	99.67	-
H10	99.05	-
IgE	99.21	99.38
IgG1	9.27	39.56
IgG2a	55.44	67.76
IgG2b	63.01	67.25

*Tabla II. Unión de anticuerpos murinos anti-DNP a receptores Fc de células cebadas de la línea RBL-2H3. Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta para FACS para determinar la unión de los anticuerpos a las células. Como anticuerpo primario se usaron diferentes subclases de anticuerpos murinos solubles o formando complejos inmunes, seguido de la adición de un anticuerpo anti-Ig de ratón acoplado a fluoresceína. Los controles negativos fueron células no estimuladas y células con anticuerpo secundaria. Como controles positivos se usaron anticuerpo anti-receptor (H10) y anticuerpo anti-receptor fluoresceinado (FITC-H10).*

Una vez que se demostró la unión de los anticuerpos de ratón a células de rata, se procedió a estudiar si esta unión era capaz de inducir la activación de alguna función celular. Se sabe que las células RBL-2H3 liberan el contenido de sus gránulos de secreción al entrecruzar sus receptores para IgE. Por lo tanto, se investigó si el entrecruzamiento de los receptores para IgG de las células RBL-2H3 podría inducir secreción. Se utilizaron distintas estrategias para

entrecruzar los receptores Fc $\gamma$ : a) adición de complejos antígeno-anticuerpo, b) adición de IgG agregada por calor, c) adición de anticuerpo soluble junto con anticuerpos anti-Ig de ratón como segundo anticuerpo, d) utilizando como estímulo eritrocitos de carnero opsonizados con los diferentes anticuerpos anti-DNP, y e) adicionar las células en suspensión a pozos recubiertos con los diversos anticuerpos (secreción en fase sólida). Con las cuatro primeras metodologías sólo se observó secreción mediada a través del Fc $\epsilon$ RI (datos no mostrados), mientras que con la última se observó además secreción con los tres anticuerpos IgG1 utilizados (Figura 5).

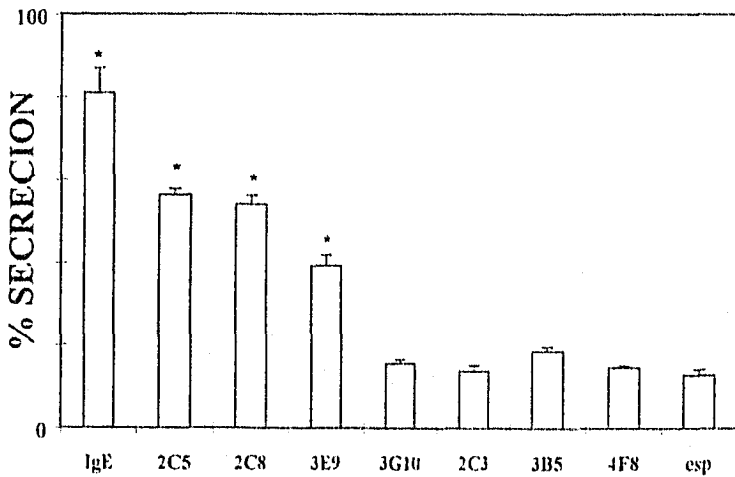


Figura 5. Activación de células cebadas de la línea RBL-2H3 por anticuerpos murinos adsorbidos a fase sólida. La activación de las células se determinó mediante la cuantificación de la liberación de la enzima  $\beta$ -hexosaminidasa. Se usaron los siguientes anticuerpos adsorbidos en placas de Elisa: IgE, IgG1: 2C5, 2C8 y 3E9, IgG2a: 2C3 y 3G10, IgG2b: 3B5 y 4F8, esp: sin anticuerpo. La barra muestra el promedio de un experimento representativo, realizado por triplicada.  $t$  de Student: \* Valor significativamente diferente al espontáneo ( $p < 0.001$ ).

Tratando de verificar si las otras subclases de anticuerpos no habían inducido respuesta porque había menor cantidad de proteína (anticuerpo) unida a la placa, se realizó conjuntamente un ELISA anti-DNP, en el cual se observó que no había menor cantidad de

anticuerpos IgG2a e IgG2b unidos a la placa en comparación a los anticuerpos de la subclase IgG1 (Figura 6).

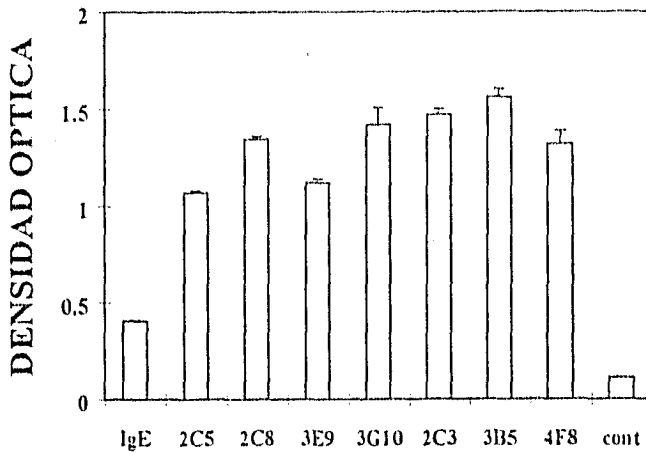
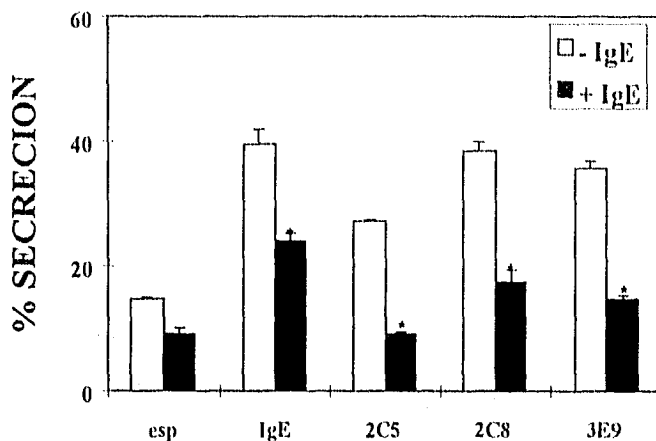


Figura 6. Cuantificación del anticuerpo unido a la fase sólida. Se realizó un ensayo de ELISA para verificar la cantidad de anticuerpo unido a las placas de ELISA usadas en los experimentos de secreción en fase sólida. Esto se llevó a cabo mediante la adición de un segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina, siendo cuantificado éste último por la hidrólisis de un sustrato. Los anticuerpos usados son los siguientes: IgE, IgG1: 2C5, 2C8 y 3E9, IgG2a: 2C3 y 3G10, IgG2b: 3B5 y 4F8. Las barras indican el promedio de un experimento realizado por triplicado.

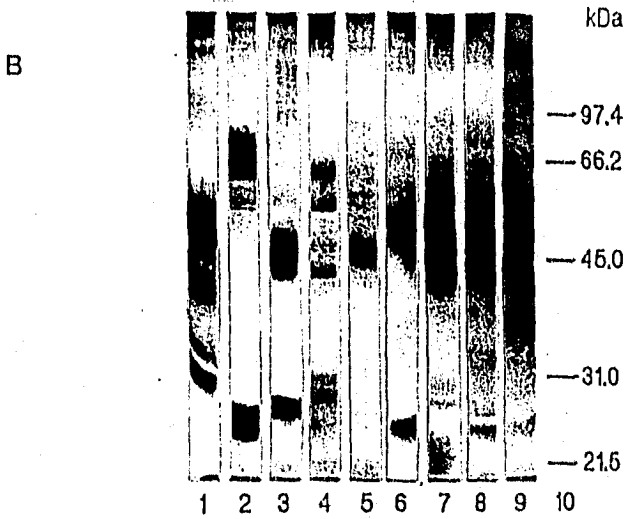
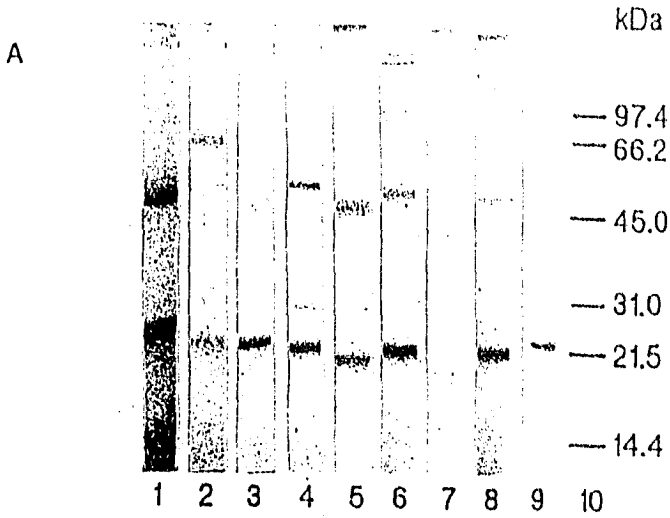
Para investigar si la secreción obtenida con los anticuerpos de la subclase IgG1 unidos a fase sólida, es mediada a través de receptores  $Fc\gamma$ , se ocuparon los receptores  $Fc\epsilon R1$  incubando previamente las células con IgE. La Figura 7 muestra que al ocupar los  $Fc\epsilon R1$  previamente al ensayo, la secreción bajaba a niveles basales, lo que indica que la secreción obtenida con los diferentes anticuerpos IgG1 era mediada por la activación del receptor de alta afinidad para IgE. Esto podría deberse a: a) una reacción cruzada entre los anticuerpos IgG1 en fase sólida y el  $Fc\epsilon R1$ , b) que los anticuerpos monoclonales IgG que se usaron en el ensayo estuvieran contaminados con IgE.





**Figura 7.** Activación de células RBL-2H3 con anticuerpos murinos unidos a fase sólida. Bloqueo del receptor de alta afinidad para IgE. Se realizó el ensayo de secreción en fase sólida, con los diferentes anticuerpos, adsorbidos a los pozos de una placa de ELISA sin previa sensibilización. Para determinar la activación celular, se cuantifica la liberación de la enzima  $\beta$ -hexosaminidasa inducida por diferentes anticuerpos IgG1. Se tomó como control positivo la secreción inducida por la estimulación de las células con IgE unida a la fase sólida. Algunas células fueron incubadas previamente con IgE monomérica, para ocupar los receptores de alta afinidad para IgE. Las barras indican el promedio de un experimento realizado por triplicado. t de Student: \* Indica diferencias significativas entre células con y sin IgE monomérica ( $p < 0.001$ ).

Para descartar esta última opción se realizó una electroforesis de los anticuerpos utilizados, haciendo tinciones con Azul de Coomassie y con plata. Se observaron bandas prominentes de peso molecular aproximado de 50 y 30 KDa en los carriles correspondientes a las diferentes subclases de IgG, mientras que en el carril 2 se observaron bandas de aproximadamente 70 y 30 KDa, las cuales corresponden al peso molecular de las cadenas pesadas y ligeras de la IgE, respectivamente (Fig. 8). Estos resultados descartan la opción b como explicación de la secreción inducida por la IgG1, pues muestran que los anticuerpos IgG no están contaminados con IgE.



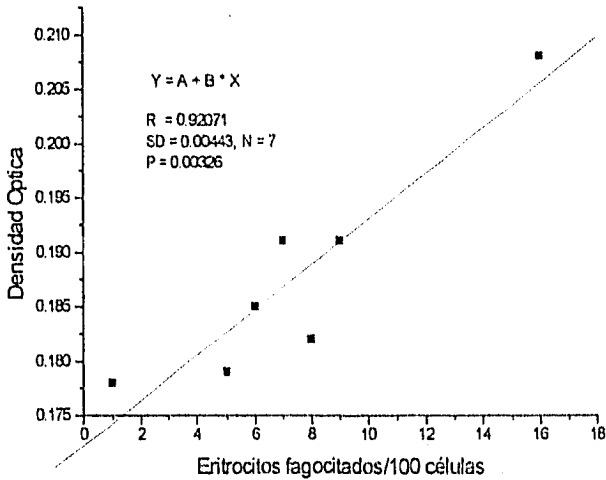
**Figura 8.** *Electroforesis en gel de acrilamida 10% de diferentes anticuerpos monoclonales anti-DNP. Carril 1: anti-receptor (H10); carril 2: IgE; carriles 3- 5: IgG1(2C5, 2C8 y 3E9, respectivamente); carriles 6 y 7: IgG2a (2C3 y 3G10, respectivamente); carriles 8 y 9: IgG2b (3B5 y 4F8, respectivamente); carril 10: marcadores de pesa molecular. A) Tinción de azul de Coomassie. B) Tinción de plata.*

Lo anterior indica que la explicación más viable es que la secreción observada con los anticuerpos IgG1 es debido a que, en ciertas circunstancias, puede llegar a darse una unión del Fc del isotipo IgG1 con el FcεR1.

Los resultados anteriores sugieren que el entrecruzamiento de los receptores Fcγ no induce secreción en las células RBL-2H3. Por lo tanto, se investigó si estos receptores pueden mediar fagocitosis de eritrocitos opsonizados. Däeron y col. (Däeron y col., 1993; Däeron y col., 1994), han demostrado que células RBL-2H3 pueden fagocitar a través de receptores Fcγ transfectados, indicando que a pesar de que los basófilos y las células cebadas eran consideradas como células no fagocíticas, las células RBL-2H3 pueden llevar a cabo esta función. Por lo tanto, se decidió investigar si las células RBL-2H3 son capaces de fagocitar GRC opsonizados con anticuerpos anti-DNP murinos de la clase IgG. En los primeros ensayos la fagocitosis se evaluó microscópicamente, observándose que las células RBL-2H3 eran capaces de fagocitar GRC opsonizados, mientras que no fagocitaban los GRC no opsonizados.

Para facilitar la evaluación de la fagocitosis, se utilizó un microensayo que permite cuantificar la fagocitosis por medio de lecturas de densidad óptica. Este ensayo se basa en la actividad de pseudoperoxidasa que tiene la hemoglobina (Hb), que en presencia de peróxido de hidrógeno y diaminobenzidina genera un producto que puede medirse espectrofotométricamente. Con este microensayo que se realiza en una placa de cultivo de 96 pozos, se puede determinar la fagocitosis en un número grande de muestras al mismo tiempo, de una manera rápida y efectiva.

El método de cuantificación de eritrofagocitosis por colorimetría, fue validado contra la observación al microscopio. Se hicieron ensayos paralelos en los cuales se determinó la fagocitosis por microscopia, comparando los resultados con los obtenidos utilizando el microensayo de la diaminobenzidina. Se graficó el número de eritrocitos fagocitados en un campo de 100 células contra los resultados obtenidos por espectrofotometría, obteniéndose un coeficiente de correlación entre ambos métodos de 0.92 (Figura 9).



**Figura 9. Correlación entre los métodos colorimétrico y microscópico de cuantificación de fagocitosis.** Se realizó un ensayo de fagocitosis en placa de 96 pozos, haciéndose la determinación por el método colorimétrico. Paralelamente, se realizó la fagocitosis en cubreobjetos, para ser evaluada por microscopía. Se contaron los eritrocitos fagocitados por 100 células y se graficaron contra los datos obtenidos por espectrofotometría.

Para tener la certeza de que la fagocitosis observada era mediada por la interacción de los anticuerpos IgG con los receptores Fcγ, era necesario bloquear la unión de la IgG a los receptores de alta afinidad para IgE. Se realizó un ensayo en el cual se determinó la inhibición de la unión de <sup>125</sup>I-IgE a los receptores FcεRI de las células RBL-2H3 por distintos anticuerpos. Los resultados de la Tabla III muestran que el anticuerpo anti-FcεRI (H10) inhibe un 98 % la unión de la <sup>125</sup>I-IgE a los receptores de alta afinidad para IgE en las células cebadas.

Anticuerpo inhibidor	Dirigido contra	Isotipo	<sup>125</sup> I-IgE unida (cpm)
			16743
B4	DNP	IgE	1602
H10	FcεRI	IgG	387
2C5	DNP	IgG1	14927
2C8	DNP	IgG1	14979
3E9	DNP	IgG1	15929
3G10	DNP	IgG2a	17123
2C3	DNP	IgG2a	16188
3B5	DNP	IgG2b	17054
4F8	DNP	IgG2b	16882

Tabla III. Inhibición de la unión de <sup>125</sup>I-IgE al FcεRI en células RBL-2H3. Células RBL-2H3 fueron incubadas por 2 hr a 4°C con los anticuerpos murinos indicados, a una concentración de  $1 \times 10^{-7}$  M. Se añadió IgE marcada radiactivamente ( $2.38 \times 10^9$  M), y se continuó la incubación a 4°C por 4 hr más. La cantidad de <sup>125</sup>I-IgE unida se determinó como se explica en material y métodos.

Aunque estos experimentos muestran que el anticuerpo H10 podrían usarse para ocupar el FcεRI, al ser el H10 un anticuerpo IgG, existe la posibilidad de que se uniese por su región Fc a los receptores Fcγ. Esto resultaría en que se inhibiera la unión de los GRC opsonizados con las diversas subclases de IgG. Para descartar esta posibilidad, se realizó un ensayo de formación de rosetas. La Figura 10 muestra que no hay diferencias significativas entre las rosetas formadas por las células RBL-2H3 y los GRC opsonizados con las diversas IgGs murinas si previamente al ensayo se incuban o no las células cebadas con anticuerpo anti-FcεRI. Por otro lado, las rosetas formadas por los GRC opsonizados con IgE se ven completamente inhibidas al incubarse previamente las células con el anticuerpo anti-FcεRI.

Estos mismos resultados se observan cuando se utilizan fragmentos Fab del anticuerpo anti-FcεRI (datos no mostrados).

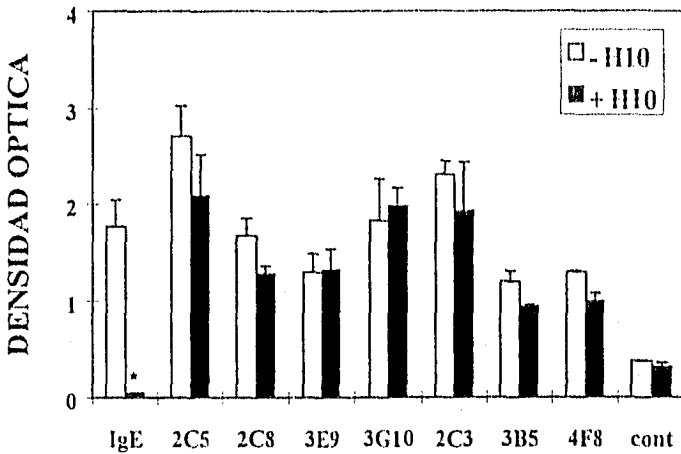


Figura 10. Efecto de la unión del anticuerpo anti-FcεRI a las células RBL-2H3 sobre la formación de rosetas. Se incubaron células RBL-2H3 con GRC opsonizados con diferentes subclases de Ig murinas. Luego de incubarlo a 4°C se lavó para retirar los eritrocitos no unidos a la célula. La cuantificación se realizó por el método de DAB. Los anticuerpos utilizados son IgE, IgG1 (2C5, 2C8 y 3E9), IgG2a (2C3 y 3G10), e IgG2b (3B5 y 4F8). Se tomó como control eritrocitos sensibilizados (no opsonizados). Las barras llenas o vacías indican células con o sin incubación previa con anticuerpo anti-FcεRI (H10), respectivamente. Experimento representativo hecho por triplicado. t de Student; \*Indica diferencia significativa entre células con y sin anticuerpo anti-FcεRI ( $p < 0.005$ ).

Una vez que se comprobó que las células RBL-2H3 eran capaces de unir anticuerpos murinos de diversas subclases, se realizaron los ensayos de fagocitosis, cuantificándola por el método colorimétrico de la DAB. Los resultados de este ensayo muestran que las células RBL-2H3 son capaces de fagocitar GRC opsonizados con anticuerpos murinos (Fig. 11). La observación de que el anticuerpo anti-FcεRI no inhibe la fagocitosis de GRC opsonizados con IgG murina, demuestra que ésta se lleva a cabo a través de receptores Fcγ y no por receptores FcεRI. La fagocitosis mediada a través de los Fcγ es de 2 a 3 veces más alta que

la fagocitosis mediada por el Fc $\epsilon$ R1, siendo la fagocitosis de GRC opsonizados con IgG2a la más eficiente. Por otro lado, la fagocitosis de GRC opsonizados con IgE se ve completamente inhibida cuando las células son previamente incubadas con anticuerpos anti-Fc $\epsilon$ R1 (H10), para bloquear el receptor de alta afinidad para IgE. Estos resultados indican que los GRC opsonizados con IgE son fagocitados a través de los receptores de alta afinidad para IgE, mientras que los GRC opsonizados con las diferentes subclases de IgG son fagocitados a través de los receptores Fc $\gamma$ .

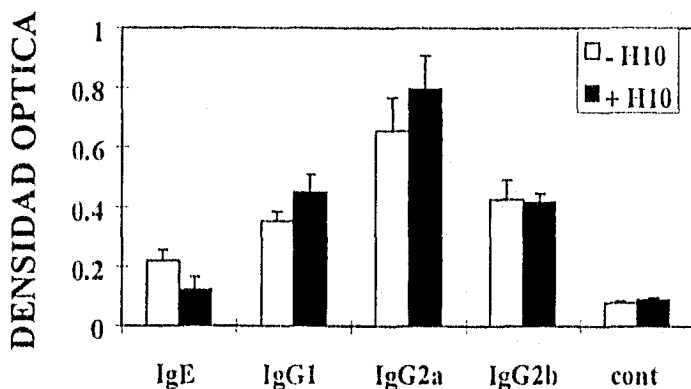


Figura 11. Efecto de la unión del anticuerpo anti-Fc $\epsilon$ R1 a las células RBL-2H3 sobre la fagocitosis. Células RBL-2H3 fueron incubadas o no (barras llenas o vacías, respectivamente) con anticuerpo anti-Fc $\epsilon$ R1 (H10) durante 1 hr a 4°C. Las células se incubaron con GRC opsonizados con diferentes subclases de Ig murina, a 37°C por 3 hr para permitir la ingestión de los eritrocitos. Los eritrocitos no ingeridos se lisaron mediante un shock hipotónico. Luego de lavar para retirar la hemoglobina liberada se lisaron las células para hacer la cuantificación de la fagocitosis mediante el método colorimétrico. Se usaron anticuerpos IgE, IgG1 (3E9), IgG2a (3G10) e IgG2b (3B5). Como control negativo se usaron eritrocitos no opsonizados. Experimento representativo hecho por triplicado. *t* de Student: \*Indica diferencia significativa entre células con y sin anticuerpo anti-Fc $\epsilon$ R1 ( $p < 0.02$ ).

Una vez que se demostró que las células RBL-2H3 son capaces de llevar a cabo fagocitosis a través de sus receptores para IgG, se procedió a estudiar si las vías bioquímicas que participaban en la fagocitosis mediada por Fc $\gamma$ R eran similares a las que se inducen por la

agregación de FcεRI, comparando en este último receptor las funciones de fagocitosis y secreción. Los parámetros que se estudiaron fueron:

- dependencia de la temperatura,
- dependencia de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio externo y
- participación de cinasas de tirosina.

Los resultados muestran que:

- a) Tanto la secreción como la fagocitosis, sólo ocurren a 37°C (Fig. 12), a temperaturas abajo de la fisiológica no hay ni fagocitosis ni secreción.
- b) Mientras que la secreción de β-hexosaminidasa es dependiente de concentraciones extracelulares de iones de  $\text{Ca}^{2+}$ , la fagocitosis mediada por ambos receptores no es dependiente de la presencia de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio externo (Fig. 13).
- c) Tanto la secreción como la fagocitosis mediada a través del FcεRI, al igual que la fagocitosis mediada a través del Fcγ requieren de la activación de cinasas de tirosina (Figura 14), ya que todas estas respuestas son inhibidas por herbimicina, un inhibidor de cinasas de tirosina.



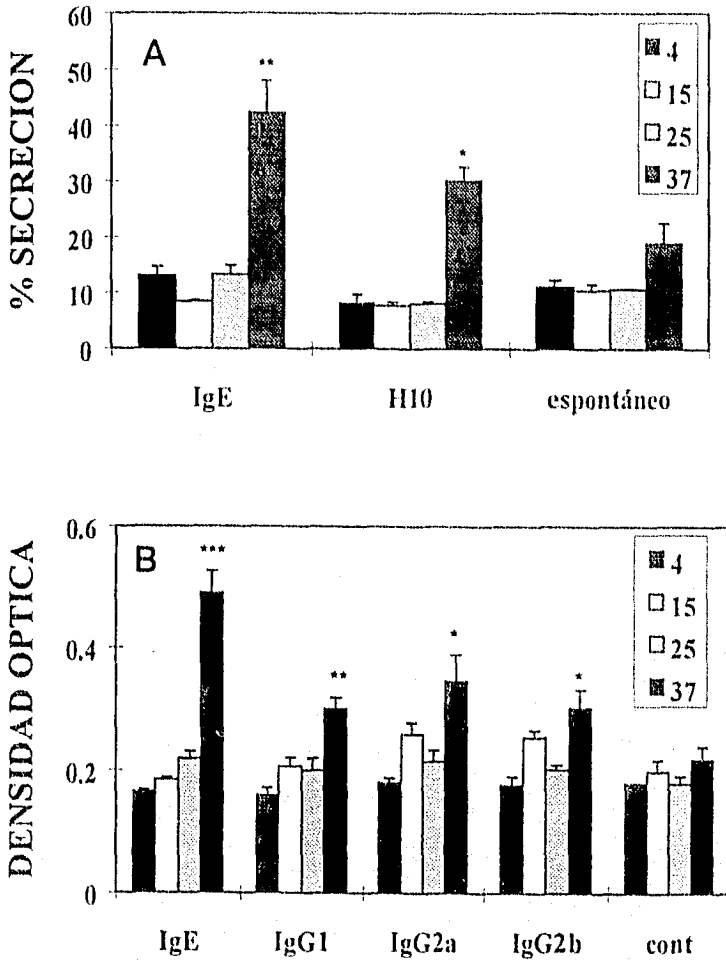


Figura 12. Efecto de la temperatura sobre la secreción (A) y la fagocitosis (B) por células RBL-2H3. Se incubaron células RBL-2H3 con GRC opsonizados con diversas Ig murinas, a diferentes temperaturas. Luego de 1 hr de incubación se tomó una alícuota del sobrenadante para cuantificar la cantidad de  $\beta$ -hexosaminidasa liberada. Luego de transcurrido el tiempo de incubación para la fagocitosis (3 hr), se cuantificó la misma por el método colorimétrico. Se usaron GRC no opsonizados como control negativo. 1 de Student; el asterisco indica diferencias con respecto al espontáneo (\* $p < 0.02$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

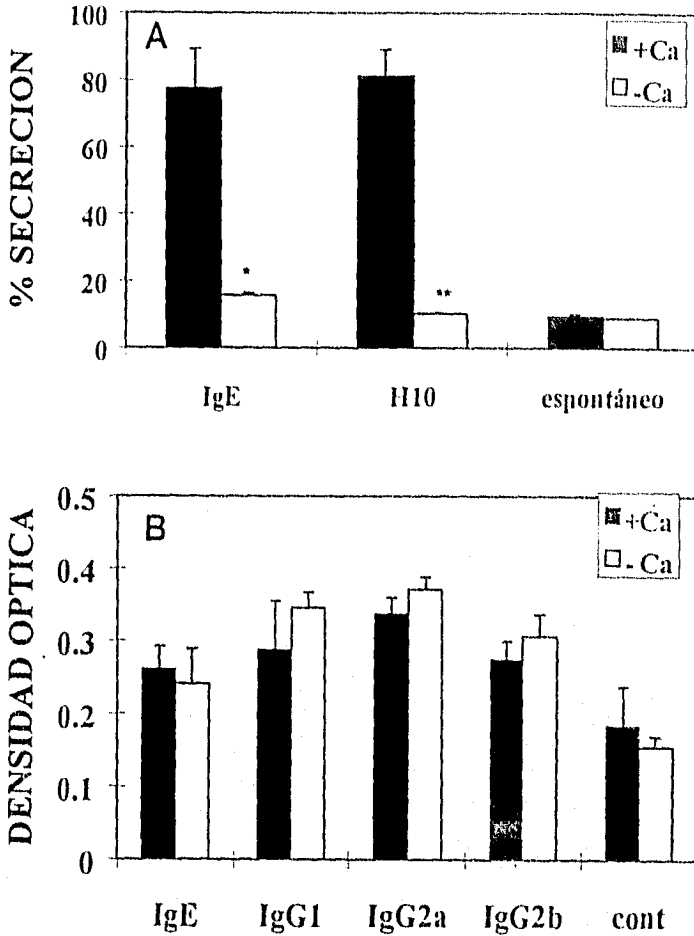


Figura 13. Efecto del  $Ca^{2+}$  sobre la secreción (A) y la fagocitosis (B) por células RBL-2H3. Se incubaron células RBL-2H3 con GRC opsonizadas con diversas Ig murinas, a  $37^{\circ}C$  en solución de Tyrode en presencia de  $Ca^{2+}$  (1.4 mM) o en ausencia del mismo ión (EDTA 2 mM). La determinación de  $\beta$ -hexosaminidasa y la cuantificación de la fagocitosis se realizaron como se indica en la figura 12. t de Student: el asterisco indica diferencias entre las células tratadas en presencia o ausencia de  $Ca^{2+}$  (\* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.005$ ).

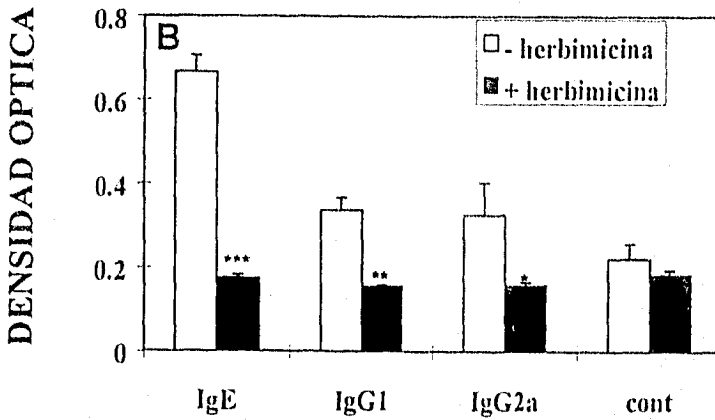
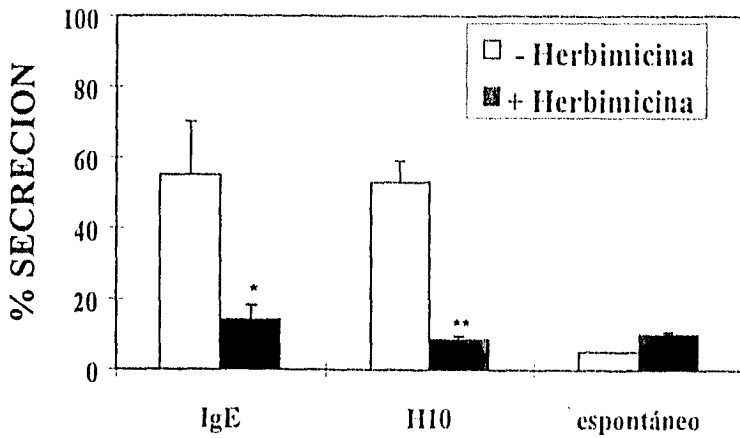


Figura 14. Efecto de la herbimicina sobre la secreción (A) y la fagocitosis (B) por células RBL-2H3. Las células RBL-2H3 se incubaron previamente o no en presencia de herbimicina ( $5 \mu\text{M}$ ) durante 18 hr. Después de esta incubación se realizaron los ensayos según la metodología descrita en la figura 12. *t* de Student; el asterisco indica las diferencias entre células tratadas o no con herbimicina (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

## CAPITULO 4

### *DISCUSION*

El receptor de alta afinidad para IgE (FceRI) y los receptores para IgG (FcγR) pertenecen a la familia de receptores multicadena de reconocimiento inmune. En vista de las semejanzas que existen entre los receptores de alta afinidad para IgE y los receptores para IgG, consideramos de interés el determinar si estos receptores comparten vías bioquímicas de señalización en un modelo celular que expresa nativamente ambos tipos de receptores.

La función más conocida de las células cebadas es la secreción de mediadores proinflamatorios, los cuales son secretados al medio extracelular en respuesta al entrecruzamiento del FceRI. Más recientemente se ha demostrado que la agregación del FceRI también induce la secreción de citocinas (Gordon y col., 1994; McKay y col., 1994; Qu y col., 1995). Aunque desde hace tiempo se sabe que las células cebadas expresan receptores para IgG, son pocos los estudios de funciones mediadas a través de receptores Fcγ en estas células. Por esta razón, uno de los primeros objetivos del presente trabajo fue determinar si la agregación de los FcγR en células RBL-2H3 podría inducir una respuesta celular y en tal caso, estudiar las vías bioquímicas involucradas en la transducción de señales a través de éstos receptores. Como ligandos de los receptores Fcγ, se utilizaron anticuerpos monoclonales de diferentes subclases de IgG, desarrollados en ratón, específicos para el hapteno DNP. El primer objetivo del presente trabajo fue verificar que los anticuerpos murinos se unieran a los receptores Fcγ de células de rata. Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta y formación de rosetas con eritrocitos opsonizados con los diferentes anticuerpos demostraron que la IgE y las diferentes subclases de IgG murina pueden unirse a las células RBL-2H3 (Tablas I y II).

Entre los escasos reportes de activación inducida por IgG en células cebadas y basófilos, podemos mencionar los siguientes: a) agregados de IgG de rata inducen secreción de histamina a través de receptores diferentes al FceRI en células cebadas aisladas de la

cavidad peritoneal de ratas y en una variante de la línea celular RBL-2H3 (McGivney y col., 1981); b) la secreción inducida por anticuerpos monoclonales de ratón del subtipo IgG1 e IgG2a en células cebadas de ratón (Däeron y col., 1980; Däeron y col., 1982); c) la secreción inducida por el entrecruzamiento de receptores para Fc $\gamma$  de ratón, transfectados en células RBL-2H3 (Alber y col. 1992).

En nuestro trabajo, tratamos de inducir la secreción de la enzima  $\beta$ -hexosaminidasa, estimulando los receptores para Fc $\gamma$ . Se utilizaron diversas metodologías para agregar los receptores, tales como de anticuerpos solubles entrecruzados con segundos anticuerpos, complejos inmunes, GRC opsonizados o anticuerpos adsorbidos en fases sólidas. Con ninguna de ellas logramos inducir secreción mediada por receptores para IgG. Las células RBL-2H3 expresan las isoformas Fc $\gamma$ RIIB y Fc $\gamma$ RIIA (Bocek y col., 1995), y dada la similitud existente las regiones extracelulares de ellas, es de suponerse que las IgGs se unen indistintamente a ambos (Ravech y Kinet, 1991). Es probable, por lo tanto, que en nuestro sistema experimental se formen heteroagregados de ambos tipos de receptores para Fc $\gamma$ . Como ya se dijo, el entrecruzar el Fc $\gamma$ RIIB junto con el receptor de antígeno de linfocitos B trae como consecuencia la abolición de las respuestas celulares (D'Ambrosio y col., 1995). Asimismo, en basófilos humanos que expresan nativamente Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIB, la coagregación de éstos no induce la liberación de histamina, aunque se presenta polimerización de actina e incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Kawata y col., 1996; Däeron y col., 1995). De estos datos, podemos proponer que en nuestro modelo experimental no observamos secreción de mediadores porque pueden estarse formando agregados de ambos receptores (Fc $\gamma$ RIIB y Fc $\gamma$ RIIA), y en caso de que pudiera darse una respuesta mediada a través del Fc $\gamma$ RII, ésta se vea inhibida por la coagregación del Fc $\gamma$ RIIB.

En vista de que no se logró inducir secreción en células RBL-2H3 a través de los receptores Fc $\gamma$ , estudiamos si estos receptores podían mediar fagocitosis. Aunque las células cebadas eran consideradas como células no fagocíticas, Däeron y col. mostraron que la línea celular RBL-2H3 transfectada con receptores Fc $\gamma$  murinos, puede llevar a cabo la ingestión de

eritrocitos de carnero opsonizados con IgG de ratón (Däeron y col., 1993; Bonnerot y Däeron, 1994; Däeron y col., 1994). Tomando en cuenta estos reportes, y habiendo probado que las células RBL-2H3 unen eritrocitos de carnero opsonizados con las diferentes subclases de IgG murina, se realizó el ensayo de fagocitosis utilizando una modificación de la técnica empleada por Däeron. Los resultados obtenidos demostraron que las células RBL-2H3 fagocitan glóbulos rojos de carnero opsonizados con IgG murina a través de receptores diferentes al FcεRI, ya que en células en las cuales se ocupa previamente el receptor de alta afinidad para IgE sigue habiendo una fagocitosis de GRC-IgG comparable a la que realizan células que no tienen ocupado el FcεRI (Figura 11). Por otro lado, también demostramos que hay fagocitosis a través del FcεRI, y que la fagocitosis de GRC-IgE baja a niveles basales cuando el receptor para IgE es ocupado con un anticuerpo anti-receptor.

Una vez que se demostró que las células RBL-2H3 pueden llevar a cabo fagocitosis mediada a través de receptores FcγR, se comenzaron a estudiar los requerimientos bioquímicos de dicha función. Se encontró que la fagocitosis de GRC-IgG y de GRC-IgE requiere de una temperatura fisiológica (37°) (Figura 12), así como de la activación de cinasas de tirosina (Figura 14); pero no de la presencia de iones de Ca<sup>2+</sup> en el medio externo (Figura 13).

Los resultados indican que el FcεRI puede mediar secreción y fagocitosis en células RBL-2H3, aunque existan diferencias en los requerimientos: la secreción de mediadores proinflamatorios requiere la presencia de iones de Ca<sup>2+</sup> en el medio externo (Razin y col., 1995) y la activación de cinasas de tirosina (Benhamou y col., 1993; Jouvin y col., 1994; Kihara y col., 1994), mientras que la fagocitosis mediada a través del FcεRI requiere de la activación de cinasas de tirosina, pero no necesita de la presencia de iones de Ca<sup>2+</sup> en el medio externo. Con respecto a los receptores Fcγ en células RBL-2H3, nuestros resultados y los de otros investigadores indican que no se induce secreción a través de estos receptores, aunque sí hay fagocitosis (Däeron y col., 1993; Däeron y col., 1994; Däeron y col., 1995). La fagocitosis mediada a través de receptores FcγR tiene los mismos requerimientos que la fagocitosis mediada por el FcεRI.

El paradigma actualmente aceptado para explicar la traducción de señales a través de receptores con motivos ITAM, sugiere que la agregación de los mismos induce la fosforilación de las tirosinas de los motivos, por un mecanismo que aún se desconoce. Estas tirosinas fosforiladas sirven de puntos de anclaje para proteínas con dominios SH2 y actividad de cinasa (*Syk* o *Src*), las cuales al unirse a los residuos de fosfotirosina, se activan, fosforilando otros sustratos como PLC $\gamma$ , MAPK, etc. La diversidad de funciones efectoras puede ser resultado de las cinasas que se unen a los ITAM fosforilados, y de los sustratos de las mismas. Esto sería regulado por:

- a) la expresión de cinasas y sustratos en un tipo celular determinado;
- b) la especificidad de unión de proteínas con dominios SH2 por diferentes ITAMs (Johnson y col., 1995);
- c) se ha sugerido que el contexto en el que se encuentra la cadena que contiene el ITAM es importante en la señalización generada por la estimulación de los receptores multicadena de reconocimiento inmune (Paolini y col., 1995).

En este trabajo, se utilizaron siempre células RBL -2H3, por lo que la expresión de cinasas y sustratos fué constante. Por lo tanto, las diferencias observadas en cuanto a la capacidad del Fc $\epsilon$ RI y el Fc $\gamma$ R para inducir o no secreción, podrían deberse a que la cadena  $\gamma$ , presente en el Fc $\gamma$ RIII y el Fc $\epsilon$ RI, interaccione con distintas moléculas con dominios SH2. Aunque a primera vista esto no parezca lógico, ya que es la misma cadena, estudios realizados por Paolini y col. han mostrado que el contexto en el cual se encuentra la cadena que contiene el ITAM, puede determinar la transducción de señales. En este contexto, conviene recordar que en el Fc $\epsilon$ RI, aparte de los ITAM de la cadena  $\gamma$ , contiene otro en la cadena  $\beta$ . Dado que, en nuestro trabajo mostramos que tanto Fc $\gamma$ R como Fc $\epsilon$ RI pueden mediar fagocitosis, pero sólo el segundo puede mediar secreción, podríamos sugerir que para esta última función es importante la presencia de la subunidad  $\beta$ .

En estudios recientes, se ha examinado la capacidad de receptores quiméricos con la porción extracelular del receptor para IL-2, con la región intracelular de la cadena  $\gamma$  ó de  $\beta$ , para inducir secreción. Estos estudios mostraron que los receptores quiméricos conteniendo la

parte citoplasmática de  $\beta$ , no inducían secreción, ni fosforilación de proteínas en residuos de tirosina. Los receptores con la porción intracelular de  $\gamma$ , sí eran capaces de inducir secreción, aunque a niveles más bajos que los observados con el Fc $\epsilon$ RI nativo (Wilson y col., 1995). Es posible entonces, que la incapacidad de obtener secreción con los Fc $\gamma$ R en nuestro sistema experimental se deba a por lo menos dos factores: i) la coagregación de los receptores Fc $\gamma$ RIIB y Fc $\gamma$ RIIA (ver arriba) y/o ii) otras características estructurales del receptor al cual se asocian las cadenas  $\gamma$ , sean importantes para esta función (por ejemplo, la presencia de  $\beta$  en el mismo complejo).

Nuestros resultados demostraron que tanto el Fc $\epsilon$ RI como los receptores Fc $\gamma$ R de células RBL-2H3, son capaces de mediar fagocitosis. Diversos autores han demostrado que para la fagocitosis mediada a través de receptores para Fc $\gamma$ , es necesaria la presencia de la cadena  $\gamma$ , tanto para el Fc $\gamma$ RI, como para el Fc $\gamma$ RIIA, ó de la secuencia consenso denominada ITAM en el Fc $\gamma$ RIIA (Odin y col., 1991; Park y col., 1992; Indik y col., 1994; Indik y col., 1995a; Indik y col., 1995b; Davis y col., 1995). La importancia del ITAM en la fagocitosis, es apoyada por la observación de que el Fc $\gamma$ RIIB (que no contiene ITAM) no es capaz de inducir fagocitosis. Otros estudios han demostrado la importancia de Syk para la fagocitosis mediada por el Fc $\gamma$ RI ó el Fc $\gamma$ RIIA (Indik y col., 1995a; Indik y col., 1995b). En base a esto, podríamos sugerir que la vía de transducción de señales que utilizan el Fc $\epsilon$ RI y el Fc $\gamma$ RIIA para realizar la fagocitosis es mediada a través de la cadena  $\gamma$  y de su cinasa asociada, Syk. En acuerdo con la aseveración anterior tenemos la observación de Benhamou y col. (1992), de que la fosforilación en tirosina de Syk es independiente de la entrada de iones de Ca<sup>2+</sup> del exterior, pues como recordaremos, la fagocitosis mediada por el Fc $\epsilon$ RI y el Fc $\gamma$ RIIA en células RBL-2H3 no depende del Ca<sup>2+</sup> presente en el exterior.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que las vías bioquímicas utilizadas para las respuestas de secreción y fagocitosis mediadas por un mismo receptor (Fc $\epsilon$ RI), no son idénticas. La razón de esta diferencia se desconoce, pues el estímulo es el mismo (GRC-IgE). Adamczewski y col. (1992) detectaron que al menos dos vías de fosforilación distintas



están involucradas en la activación de las células cebadas: una que permite la fosforilación de las subunidades del receptor y de la mayoría de los sustratos celulares y que no es inhibida por óxido de fenilarsina (PAO), y la otra, que puede ser completamente independiente o que diverge de la primera, permitiendo la fosforilación de la PLC- $\gamma$ 1, siendo esta vía la requerida por todos los eventos de activación comunmente medidos (incremento de  $Ca^{2+}$ , recambio de PI), incluyendo la degranulación. Hampe y col. (1994), observaron que dos fosfatasa participan en la señalización del Fc $\epsilon$ RI, pues vieron que el incremento en la actividad de fosfatasa era inhibida mayormente por iones de vanadato, mientras que no era afectada por PAO. Estos patrones de inhibición sugieren que el incremento de la actividad de fosfatasa podría deberse a una de las enzimas descritas por Adamczewski y col., la cual es insensible al PAO y sensible a los iones de vanadato.

En otro contexto, se ha demostrado para el receptor de antígeno de linfocitos B que las cadenas involucradas en la señalización ( Ig $\alpha$  e Ig $\beta$ ) se acoplan a distintos efectores citoplasmáticos (Clark y col., 1992; Kim y col., 1993; Sanchez y col., 1993), sugiriendo que existen 2 diferentes vías de activación que son inducidas en paralelo por la agregación de dicho receptor. En el Fc $\epsilon$ RI se han detectado distintas cinasas de tirosina asociadas a las cadenas involucradas en la transducción de señales: *Syk* con la cadena  $\gamma$  y *Lyn* con la cadena  $\beta$  (Jouvin y col., 1994; Kihara y col., 1994). Teniendo en cuenta los datos anteriores, podemos sugerir que las dos vías de transducción de señales detectadas en el Fc $\epsilon$ RI difieren en la necesidad de activación de *Lyn*. En otros modelos celulares, se ha observado que la cinasa *Syk* es suficiente para mediar fagocitosis, y la activación de *Syk* se puede dar por la agregación de receptores con cadenas  $\gamma$  (Fc $\gamma$ RI y/o Fc $\gamma$ RIII). Para que se induzca secreción es necesaria la activación de *Lyn*, que probablemente actúe sobre otros sustratos además de  $\gamma$ . La identidad de éstos se desconoce. Sin embargo, Rivera y col. (1995), demostraron que la agregación de receptores quiméricos que contienen en su porción citoplasmática la secuencia de la cinasa *Syk*, es suficiente para inducir la fosforilación en tirosina y la liberación de mediadores alérgicos de las células RBL-2H3. Esto último, sin embargo, no descarta la posibilidad de que en los receptores nativos, la participación de *Lyn* es requerida para la activación de *Syk*.

Se ha visto que uno de los primeros eventos que ocurren luego del entrecruzamiento del FcεRI es la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, evento común en la transducción de señales a través de distintos receptores de membrana (Connelly y col., 1991; Benhamou y col., 1992; Heldin, 1995). En el modelo de macrófagos murinos se ha observado la fosforilación en tirosina de la cadena γ y del FcγRI y FcγRIII, así como de una serie de proteínas entre las cuales se encuentra la paxilina (proteína que se asocia al citoesqueleto), y la activación de la cinasa *Syk*. Estos eventos integran la cascada de señales que unen los receptores Fcγ con el citoesqueleto (Greenberg y col., 1994). Tomando en cuenta lo anterior, podemos sugerir que la cadena γ sea la responsable de la transducción de señales para poder realizar la fagocitosis en el modelo experimental objeto del presente trabajo.

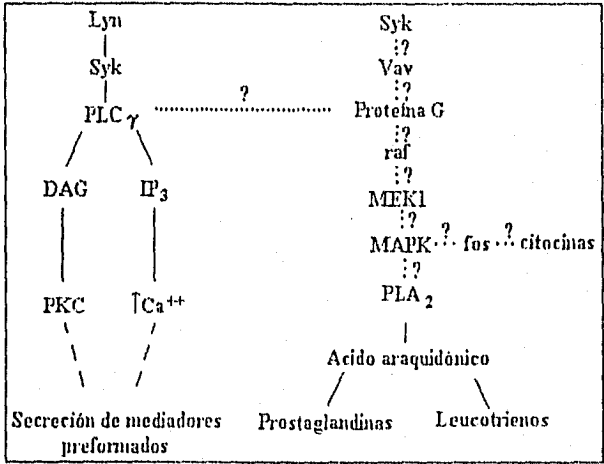
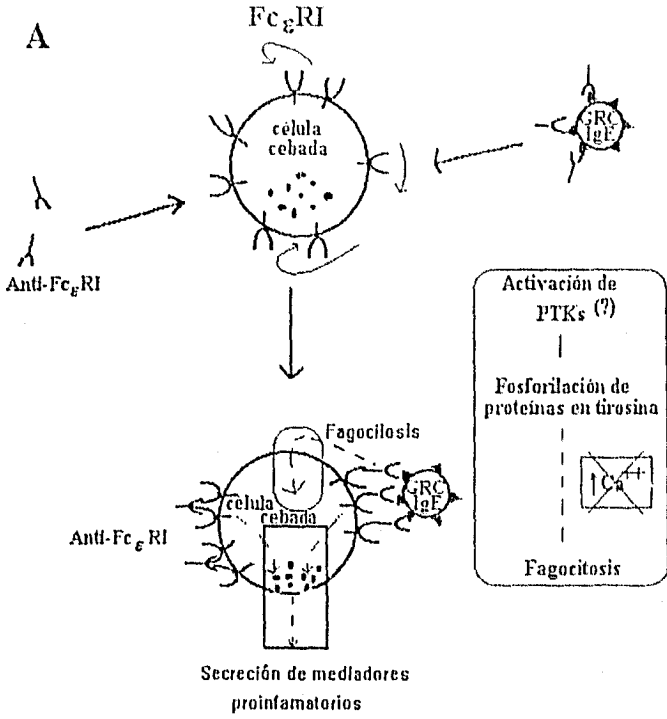
Existen diferencias en cuanto al papel que tiene el incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular en la vía de señalización de la fagocitosis, pues se ha visto que el requerimiento de  $Ca^{2+}$  depende del tipo celular, de la isoforma del receptor, etc. En macrófagos murinos de la línea J774 se ha observado que es necesaria una concentración óptima de  $Ca^{2+}$  en el citosol (niveles micromolares) para que se pueda llevar a cabo la fagocitosis mediada por receptores para Fcγ (Young y col., 1984). En neutrófilos humanos se ha observado que el 55 % de la fagocitosis mediada por receptores para Fcγ es dependiente de la entrada de iones de  $Ca^{2+}$  del medio externo, y que la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina es necesaria para que lleve a cabo el incremento de iones de  $Ca^{2+}$  en el citosol y pueda realizarse la fagocitosis. Sin embargo, el 45 % de la fagocitosis restante no es dependiente de iones de  $Ca^{2+}$  en el citosol (Kobayashi y col., 1995). Estos resultados concuerdan con lo observado por Rosales y Brown (1991), en el mismo modelo celular. Ellos concluyen que hay dos mecanismos involucrados en la fagocitosis mediada por receptores para IgG en neutrófilos activados. Uno, estimulado por un factor quimiotáctico (FMLP), es dependiente del incremento de iones de  $Ca^{2+}$  en el citosol, y es mediado por el FcγRII. Mientras que el otro, activado por ésteres de forbol y el factor activante de plaquetas (PAF) puede mediar altos niveles de fagocitosis a muy bajas concentraciones de iones de  $Ca^{2+}$  intracelular. Asimismo,

macrófagos peritoneales murinos ( McNeil y col., 1986) y macrófagos de la línea celular J774 (Di Virgilio y col, 1988) son capaces de llevar a cabo la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgG, a bajas concentraciones o en ausencia de iones de  $Ca^{2+}$ . Por lo tanto, es posible proponer que en nuestro modelo, no se requiere  $Ca^{2+}$  para la fagocitosis, y que ésta puede ser mediada a través del Fc $\gamma$ RIIA.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo y tomando en cuenta los datos bibliográficos reportados, se propone el siguiente modelo de activación de células RBL-2H3 a través de receptores para Fc (Fig. 15):

El entrecruzamiento del Fc $\epsilon$ RI da como resultado la fosforilación en residuos de tirosina de las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  del receptor, así como la fosforilación y activación de las cinasas de tirosina *Lyn* y *Syk*, y de la PLC $\gamma$ -1. Esto último va a generar un incremento de iones de  $Ca^{2+}$  en el citosol, debido a la generación de  $IP_3$  y la activación de la PKC, liberando  $Ca^{2+}$  de las pozas internas y permitiendo la entrada de  $Ca^{2+}$  del exterior. Todas estas señales son necesarias para la secreción de mediadores proinflamatorios, contenidos en los gránulos de secreción. Asimismo, se generan señales que van a activar la PLA $_2$ , lo cual trae como consecuencia la síntesis *de novo* de derivados del ácido araquidónico, tales como leucotrienos y prostaglandinas. Por otro lado, la vía para la fagocitosis diverge antes de la necesidad de  $Ca^{2+}$ , pero después de la fosforilación en tirosina.

La agregación de los Fc $\gamma$ Rs por eritrocitos opsonizados con IgG, trae como consecuencia la activación de cinasas de tirosina, lo cual se deduce de la observación de que la fagocitosis se ve inhibida por el uso de herbimicina. Al igual que la fagocitosis mediada por los receptores para IgE, la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ Rs no necesita de la entrada de iones de  $Ca^{2+}$  del exterior. Pero, a diferencia de lo ocurrido con los Fc $\epsilon$ RI, el entrecruzamiento de los receptores para IgG no induce secreción de mediadores proinflamatorios.



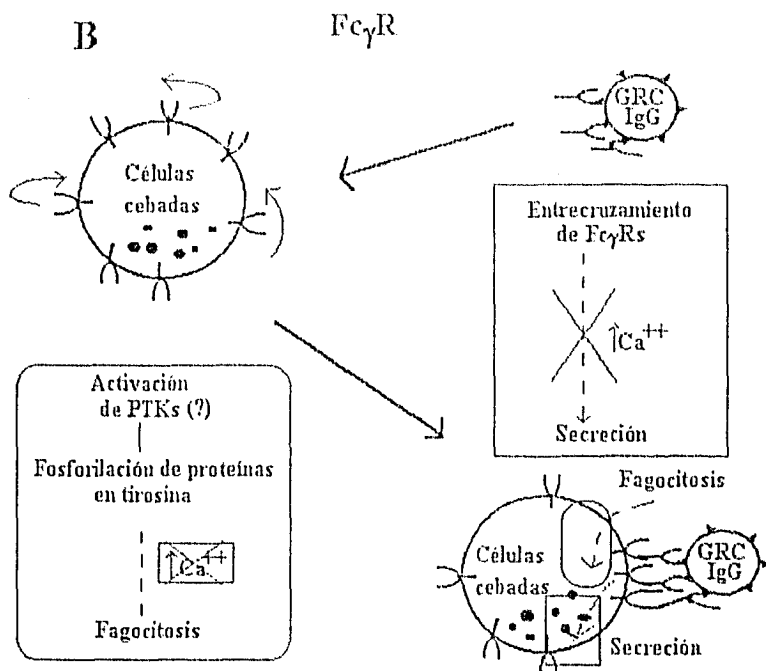
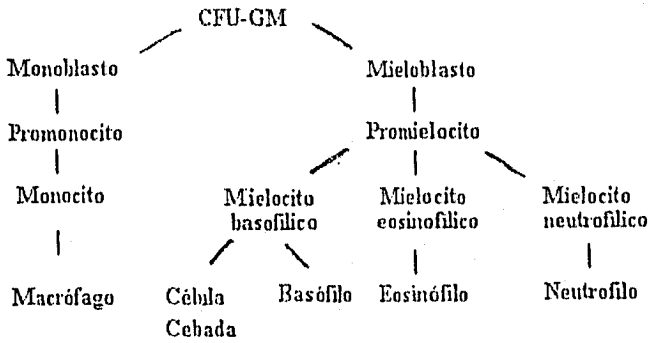


Figura 15. Vías de activación de receptores Fc en células cebadas RBL-2H3. Esquema basado en los datos obtenidos en el presente trabajo y en reportes bibliográficos. A) FcεRI: Receptor de alta afinidad para IgE. B) FcγR: Receptor para IgG. Los recuadros muestran lo que se sabe acerca de las vías bioquímicas que dan lugar a la secreción de mediadores proinflamatorios, así como lo que se conoce hasta el momento acerca de las vías involucradas en la fagocitosis. Anti-FcεRI: H10; PTKs: Cinasas de tirosina; GRC-IgE: Eritrocitos de carnero opsonizados con IgE; GRC-IgG: Eritrocitos de carnero opsonizados con IgG; Ca<sup>++</sup>: entrada de calcio extracelular; Lyn y Syk: Cinasas de la familia Src; PLCγ: Fosfolipasa Cγ; DAG: diacilglicerol; IP<sub>3</sub>: 1,4,5-inositol trifosfato; PKC: Proteína cinasa C; PLA<sub>2</sub>: Fosfolipasa A<sub>2</sub>; MAPK: Proteína cinasa activada por mitógeno; fos: factor de transcripción; MEK1: Cínasa activadora de MAPK; raf: cínasa de serina/treonina; Vav: factor activador de ras. Las líneas punteadas representan pasos de la cascada de señalización que no están plenamente comprobados en este modelo celular.

Para una comprensión más detallada de nuestros resultados es necesario caracterizar: a) las cinasas de tirosina activadas por FcεRI y por FcγRIII, b) las proteínas que son fosforiladas

al activar cada uno de estos receptores a través de diferentes estímulos y e) determinar cuáles son las cinasas asociadas a cada tipo de receptor, tanto antes como después de su agregación. Esto nos permitirá comprender un poco más acerca de las vías de señalización involucradas en cada una de las funciones celulares inducidas por la agregación de receptores para Fc en células cebadas.

Como ya se dijo anteriormente, las células cebadas se habían considerado como células no fagocíticas, y el hecho que se haya demostrado que sí pueden llevar a cabo esta función, puede implicar que en el proceso de diferenciación las células cebadas y los basófilos fueron perdiendo esa capacidad. Sin embargo, las células cebadas en ciertas condiciones son capaces de fagocitar, aunque en mucho menor grado que las células consideradas fagocíticas (monocitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos). Todos estos tipos celulares se derivan de un progenitor común, unidad formadora de colonias- granulocito macrófago (CFU-GM) (Gurish y col., 1995), como puede observarse en la figura 16. En este esquema podemos ver que todas las células derivadas de la CFU-GM tienen capacidad fagocítica, aunque algunas de ellas en menor grado que otras. La disminución de la capacidad fagocítica de las células cebadas puede deberse a los cambios ocurridos en la diferenciación y a la especialización de cada tipo celular.



**Fig. 16.** Diferenciación de las células con capacidad fagocítica. Esquema de la diferenciación de las células fagocíticas a partir de la unidad formadora de colonias - granulocito-macrófago (CFU-GM).

## CAPITULO 5

### BIBLIOGRAFIA

- Adamczewski M., Paolini R., Kinet J.P. (1992). *Evidence for two distinct phosphorylation pathways activated by high affinity immunoglobulin E receptors*. J. Biol. Chem., Vol. 267: 18126-18132.
- Agarwal A., Salem P., Robbins K. (1993). *Involvement of p72<sup>src</sup>, a protein-tyrosine kinase, in Fcγ receptor signaling*. J. Biol. Chem. Vol. 268: 15900-15905
- Alber G., Kent U.M., Metzger H. (1992). *Functional comparison of FcεRI, FcγRII, and FcγRIII in mast cells*. J. Immunol., Vol. 149: 2428-2436.
- App H., Hazan R., Zilberstein A., Ullrich A., Schlessinger J., Rapp U. (1991). *Epidermal growth factor (EGF) stimulates association and kinase activity of Raf-1 with the EGF receptor*. Mol. Cell Biol., Vol. 11: 913-919.
- Azzoni L., Kamoun M., Salcedo T., Kanakaraj P., Perussia B. (1992). *Stimulation of FcγRIII results in phospholipase C-γ1 tyrosine phosphorylation and p56<sup>lck</sup> activation*. J. Exp. Med., Vol. 176: 1745-1750.
- Baltensperger K., Kozma L., Cherniack A., Klarlund J., Chawla A., Banerjee U., Czech P. (1993). *Binding of the ras activator Son of Sevenless to insulin receptor substrate-1 signaling complexes*. Science, Vol. 260: 1950-1952.
- Baron V., Kaliman P., Gautier N., Van Obberghen E. (1992). *The insulin receptor activation process involves localized conformational changes*. J. Biol. Chem., Vol. 267: 23290-23294.
- Barsumian E.L., Isersky C., Petrino M.G., Siraganian R.P. (1981). *IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones*. Eur. J. Immunol. 11: 317.
- Beaven M., Metzger H. (1993). *Signal transduction by Fc receptors: the FcεRI case*. Immunology Today, Vol. 14: 222-226.

- Benhamou M., Ryba N., Kihara H., Nishikata H., Siraganian R. (1993). *Protein tyrosine Kinase p72<sup>9k</sup> in high affinity IgE receptor signaling*. J. Biol. Chem., Vol. 268: 23318-23324.
- Bieber T., de la Salle H., Wollenberg A., Hakimi J., Chizzonite R., Ring J., Hanau D., de la Salle C. (1992). *Human Epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (FcεRI)*. J. Exp. Med., Vol. 175: 1285-1290.
- Bieber T. (1994). *FcεRI on human Langerhans cells: a receptor in search of new functions*. Immunology Today, Vol. 15: 52-53.
- Bocek P.Jr., Draberova L., Draber P., Pecht I. (1995). *Characterization of Fc gamma receptors on rat mucosal mast cells using a mutant Fc epsilon RI-deficient rat basophilic leukemia line*. Eur. J. Immunol. 25: 2948-2955.
- Bonnerot C., Däeron M. (1994). *Biological activities of murine low-affinity Fc receptors for IgG*. Immunomethods, 4: 41-47.
- Burkhardt A., Brunswick M., Bolen J., Mond J. (1991). *Anti-immunoglobulin stimulation of B lymphocytes activates src-related protein-tyrosine kinases*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88: 7410-7414.
- Burkhardt A., Costa, T., Misulovin Z., Stealy B., Bolen J., Nussenzweig M. (1994). *Igα and Igβ are functionally homologous to the signaling proteins of the T-cell receptor*. Mol. Cel. Biol. Vol. 14: 1095-1103.
- Campbell K., Hager E., Friedrich J., Cambier J. (1991). *IgM antigen receptor complex contains phosphoprotein products of B29 and mb-1 genes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88: 3982-3986.
- Capel P., van de Winkel J., van den Herik-Oudijk I., Verbeek J. (1994). *Heterogeneity of human IgG Fc receptors*. Immunomethods, 4: 25-34.
- Carter R., Park D., Rhee S., Fearon D. (1991). *Tyrosine phosphorylation of phospholipase C induced by membrane immunoglobulin in B lymphocytes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88: 2745-2749.
- Chan A., Irving B., Frase J., Weiss A. (1991). *The ζ chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphotyrosine phosphoprotein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88: 9166-9170.



- Chan A., Iwashima M., Turck C., Weiss A. (1992). *ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR  $\zeta$  chain*. Cell, Vol. 71: 649-662.
- Clark M., Campbell K., Kazlauskas A., Hertz M., Potter T., Pleiman C., Cambier J. (1992). *The B cell antigen receptor complex: association of Ig- $\alpha$  and Ig- $\beta$  with distinct cytoplasmic effectors*. Science, Vol. 258: 123-126.
- Cone C., Lu Y., Trevillyan J., Bjorndahl J., Phillips C. (1993). *Association of the p56<sup>lck</sup> protein tyrosine kinase with the Fc $\gamma$ RIIA/CD16 complex in human natural killer cells*. Eur. J. Immunol., 23: 2488-2497.
- Connelly P., Farrel C., Merenda J., Conklyn M., Showell H. (1991). *Tyrosine phosphorylation is an early signaling event common to Fc receptor crosslinking in human neutrophils and rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3)*. Biochem. and Bioph. Res. Com. Vol. 177: 192-201.
- D'Ambrosio D., Hippen K., Minskoff S., Mellman Y., Pani G., Siminovitch K., Cambier J. (1995). *Recruitment and activation of PTPIC in negative regulation of antigen receptor signaling by Fc $\gamma$ RIIB1*. Science Vol. 268: 293-297.
- Däron M., Prouvost-Danon A., Voisin G.A. (1980). *Mast cell membrane antigens and Fc receptors in anaphylaxis. II. Functionally distinct receptors for IgG and for IgE on mouse mast cells*. Cellular Immunol. 49: 178-189.
- Däron M., Couderc J., Ventura M., Liacopoulos P., Voisin G.A. (1982). *Anaphilactic properties of mouse monoclonal IgG2a antibodies*. Cellular Immunol. 70: 27-40.
- Däron M., Malbec. O., Latour S., Bonnerot C., Segal D., Fridman W. (1993). *Distinct intracytoplasmic sequences are required for endocytosis and phagocytosis via murine Fc $\gamma$ RII in mast cells*. Int. Immunol., Vol. 5: 1393-1401.
- Däron M., Malbec. O., Bonnerot C., Latour S., Segal D., Fridman W. (1994). *Tyrosine containing activation motif-dependent phagocytosis in mast cells*. J. Immunol., 152: 783-792.
- Däron M., Latour S., Malbec O., Espinosa E., Pina P., Pasmans S., Fridman W.H. (1995). *The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc $\gamma$ RIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation*. Immunity, Vol. 3: 635-646.

- Darby C., Geahlen R., Schreiber A. (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.
- Dasgupta J., Granja C., Druker B., Lin L., Yunis E., Relias V. (1992). *Phospholipase C-γ1 association with CD3 structure in T cells.* J. Exp. Med., Vol. 175: 285-288.
- Davis W., Harrison P., Hutchison M., Allen J. (1995). *Two distinct regions of FcγRI initiate separate signaling pathways involved in endocytosis and phagocytosis.* EMBO J., Vol. 14: 432-441.
- Di Virgilio F., Meyer B., Greenberg S., Silverstein S. (1988). *Fc receptor-mediated phagocytosis occurs in macrophages at exceedingly low cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels.* J. Cell. Biol. 106: 657-666.
- Durden D., Rosen H., Cooper J. (1994). *Serine/threonine phosphorylation of the γ-subunit after activation of the high-affinity Fc receptor for immunoglobulin G.* Biochem. J., 299: 569-577.
- Eiseman E., Bolen J. (1992). *Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases.* Nature, Vol. 355: 78-80.
- Ernst L., Duchemin A., Anderson C. (1993). *Association of the high-affinity receptor for IgG (FcγRI) with the γ subunit of the IgE receptor.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 90: 6023-6027.
- Ghazizadeh S., Fleit H. (1994). *Tyrosine phosphorylation provides an obligatory early signal for FcγRII-mediated endocytosis in the monocytic cell line THP-1.* J. Immunol. 152: 30-41.
- Glaichenhaus N., Shastri N., Littman D., Turner J. (1991). *Requirement for association of p56<sup>lck</sup> with CD4 in antigen-specific signal transduction in T cells.* Cell, Vol. 64: 511-520.
- Goding J.W. (1983). En: *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice.*
- Gordon J.R., Galli S.J. (1994). *Promotion of mouse fibroblast collagen gene expression by mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. Role for mast cell-derived transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha.* J. Exp. Med. 180: 2027-2037.

- Greenberg S., Chang P., Silverstein S. (1994). *Tyrosine phosphorylation of the gamma subunit of Fc gamma receptors, p72<sup>syk</sup>, and paxillin during Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages*. J. Biol. Chem. Vol. 269: 3897-3902.
- Gurish M., Austen F. (1989). *Different mast cells mediators produced by different mast cells phenotypes*. En: IgE, mast cells and the allergic response. Ciba Foundation Symposium 147. 36-52.
- Gurish M., Pear W., Stevens R., Scott M., Sokol K., Ghildyal N., Webster M., Hu X., Austen K., Baltimore D., Friend D. (1995). *Tissue-regulated differentiation and maturation of a v-abl-immortalized mast cell-committed progenitor*. Immunity, Vol. 3: 175-186.
- Hamada F., Aoki M., Akiyama T., Toyoshima K. (1993). *Association of immunoglobulin G Fc receptor II with Src-like protein-tyrosine kinase Fgr in neutrophils*. Proc. Natl. Acad. Sci USA, Vol. 90: 6305-6309.
- Hampe C., Pecht I. (1994). *Protein tyrosine phosphatase activity enhancement is induced upon Fcε receptor activation of mast cells*. FEBS Letters, 346: 194-198.
- Heldin C. (1995). *Dimerization of cell surface receptors in signal transduction*. Cell, Vol. 80: 213-223.
- Hutchcroft J., Geahlen R., Deanin G., Oliver J. (1992). *FcεRI-mediated tyrosine phosphorylation and activation of the 72-kDa protein-tyrosine kinase, PTK72, in RBL-2H3 rat tumor mast cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 89: 9107-9111.
- Ihle J., Witthuhn B., Quelle F., Yamamoto K., Thierfelder W., Kreider B., Silvennoinen O. (1994). *Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs*. Trends in Biology Science, 19: 222-227.
- Indik Z., Hunter S., Huang M., Pan X., Chien P., Kelly C., Levinson A., Kimberly R., Schreiber A. (1994). *The high affinity Fc gamma receptor (CD64) induces phagocytosis in the absence of its cytoplasmic domain: the gamma subunit of Fc gamma R11A imparts phagocytic function to Fc gamma R1*. Exp. Hematol. 22: 599-606.
- Indik Z., Park J., Hunter S., Schreiber A. (1995a). *The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis*. Blood 86: 4389-4399.
- Indik Z., Park J., Hunter S., Schreiber A. (1995b). *Structure/function relationships of Fc gamma receptors in phagocytosis*. Semin. Immunol. 7: 45-54.

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

Johnson S.A., Pleiman C.M., Pao L., Schneringer J., Hippen K., Cambier J.C. (1995). *Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases*. J. Immunol. 155: 4596-4603.

Jouvin M., Adamczewski M., Numerof R., Letourner O., Vallé A., Kinet J. (1994). *Differential control of the tyrosine kinases Lyn and Syk by the two signaling chains of the high affinity immunoglobulin E receptor*. J. Biol. Chem., Vol. 269: 5918-5925.

June C., Fletcher M., Ledbetter J., Schieven G., Siegel J., Phillips A., Samelson L. (1990). *Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents T-cell receptor-mediated signal transduction*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 87: 7722-7726.

Jungi T. (1985). *A rapid and sensitive method allowing photometric determination of erythrophagocytosis by mononuclear phagocytes*. J. Immunol. Methods, 82: 141.

Kawata N., Takata M., Suwaki T., Tanimoto Y., Soda R., Takahashi K., Kimura I. (1996). *Signal transduction by IgG receptors induces calcium mobilization, but not histamine release, in the human basophilic cell line KU812F*. Int. Arch. Allergy Immunol. Vol 9: 27-34.

Kazlauskas A., Kashishian A., Cooper J., Valius M. (1992). *GTPase-activating protein and phosphatidylinositol 3-kinase bind to distinct regions of the platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  subunit*. Mol. Cell Biol. Vol 12: 2534-2544.

Keegan A., Paul W. (1992). *Multichain immune recognition receptors*. Immunology Today, Vol. 13 (2): 63-68.

Kiener P., Rankin B., Burkhardt A., Schieven G., Gilliland L., Rowley B., Bolen J., Ledbetter A. (1993). *Cross-linking of Fc $\gamma$  Receptor I (Fc $\gamma$ RI) and the receptor II (Fc $\gamma$ 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. Vol. 268 (32): 24442-24448.

- Kihara H., Siraganian R. (1994). *Src* homology 2 domains of *Syk* and *Lyn* bind to tyrosine-phosphorylated subunits of the high affinity IgE receptor. *J. Biol. Chem.*, Vol. 269: 22427-22432.
- Kim K., Alber G., Weiser P., Reth M. (1993). *Differential signaling through the Ig- $\alpha$  and Ig- $\beta$  components of the B cell antigen receptor.* *Eur. J. Immunol.* 23: 911-916.
- Kinet J., Metzger H. (1990). *Genes, structure, and actions of the high-affinity Fc receptor for immunoglobulin E.* En: *Fc receptors and the action of antibodies.* American Society for Microbiology. 239-259.
- Kobayashi K., Takehashi K., Nawasawa S. (1995). *The role of tyrosine phosphorylation and  $Ca^{2+}$  accumulation in Fc $\gamma$ -receptor-mediated phagocytosis of human neutrophils.* *J. Biochem.* 117: 1156-1161.
- Kolanus W., Romeo C., Sedd B. (1993). *T cell activation by clustered tyrosine kinases.* *Cell*, Vol. 74: 171-183.
- Kosayu S., McConkey D., Clayton L., Abraham S., Yandava B., Katahira T., Moingeon P., Yamamoto T., Reinherz E. (1992). *Phosphorylation of multiple CD3 $\zeta$  tyrosine residues leads to formation of pp21 in vitro and in vivo. Structural changes upon T cell receptor stimulation.* *J. Biol. Chem.*, Vol. 267: 3375-3381.
- Kuroski T., Gander L., Wirthmueller U., Ravetch J. (1992). *The  $\beta$  subunit of the Fc $\epsilon$ R1 is associated with the Fc $\gamma$ R111 on Mast cells.* *J. Exp. Med.*, Vol. 175: 447-451.
- LePrince C., Draves K., Ledbetter J., Torres R., Clark E. (1992). *Characterization of molecular components associated with surface immunoglobulin M in human B lymphocytes: presence of tyrosine and serine/threonine protein kinases.* *Eur. J. Immunol.* 22: 2093-2099.
- Li W., Deanin G., Margolis B., Schlessinger J., Oliver J. (1992). *Fc $\epsilon$ R1-mediated tyrosine phosphorylation of multiple proteins, including phospholipase C $\gamma$ 1 and the receptor  $\beta_2$  complex, in RBL-2H3 rat basophilic leukemia cells.* *Mol. Cel. Biol.* Vol. 12 (7): 3176-3182.
- Liao F., Shin H., Rhee S. (1992). *Tyrosine phosphorylation of phospholipase C- $\gamma$ 1 induced by cross-linking of the high-affinity Fc-receptor for IgG in U937 cells.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 89: 3659-3663.

- Liao F., Shin H., Rhee S. (1993). *Cross-linking of Fc $\gamma$ R1IIA on natural killer cells results in tyrosine phosphorylation of PLC- $\gamma$ 1 and PLC- $\gamma$ 2*. J. Immunol., Vol. 150: 2668-2674.
- Lin J., Justement L. (1992). *The mb-1/h29 heterodimer couples the B cell antigen receptor to multiple src family protein tyrosine kinases*. J. Immunol., Vol. 149: 1548-1555.
- McGivney A., Segal D., Basciano L.K., Siraganian R.P. (1982). *The IgG subclass specificity for binding and histamine release by rat basophilic leukemia cells*. Federation Proceedings. Vol. 41: 825.
- McKay D., Bienenstock J. (1994). *The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract*. Immunol. Today, Vol. 15: 533-537.
- McNeil P., Swanson J., Wright S., Silvestein S., Taylor D. (1986). *Fc-receptor-mediated phagocytosis occurs in macrophages without an increase in average [Ca<sup>++</sup>]*. J. Cell. Biol. 102: 1586-1592.
- Masuda M., Roos D. (1993). *Association of all three types of Fc $\gamma$ R (CD64, CD 32, and CD16) with a  $\gamma$ -chain homodimer in cultured human monocytes*. J. Immunol., Vol. 151: 7188-7195.
- Maurer D., Fiebiger E., Reininger B., Wolff-Winiski B., Jouvin M., Kilgus O., Kinet J., Sting G. (1994). *Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (Fc $\epsilon$ R1) on monocytes of atopic individuals*. J. Exp. Med., Vol. 179: 745-750.
- Metzger H. (1992). *Transmembrane signaling: the joy of aggregation*. J. Immunol., Vol. 149: 1477-1487.
- Murakami M., Rosen O. (1991). *The role of insulin receptor autophosphorylation in signal transduction*. J. Biol. Chem., Vol. 266: 22653-22660.
- Odin J., Edberg J., Painter C., Kimberly R., Unkeless J. (1991). *Regulation of phagocytosis and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> flux by distinct regions of an Fc receptor*. Science. 254: 1785-1788.
- Oliver J., Burg D., Wilson B., McLaughlin J., Geahlen R. (1994). *Inhibition of mast cell Fc $\epsilon$ R1-mediated signaling and effector function by the Syk-selective inhibitor, piceatannol*. J. Biol. Chem. Vol. 269: 29697-29703.
- Ortega E., Scheider H., Pecht I. (1991). *Possible interactions between the Fc $\epsilon$  receptor and a novel mast cell function-associated antigen*. Int. Immunol., Vol. 3: 333-342.

- Paolini R., Numerof R., Kinet J. (1992). *Phosphorylation/dephosphorylation of high-affinity IgE receptors: a mechanism for coupling/uncoupling a large signaling complex*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 89: 10733-10737.
- Paolini R., Numerof R., Kinet J. (1994). *Kinase activation through the high-affinity receptor for immunoglobulin E*. Immunomethods 4: 35-40.
- Paolini R., Renard V., Vivier E., Ochiái K., Jouvin M., Malissen B., Kinet J. (1995). *Different roles for the Fc epsilon RI gamma chain as a function of the receptor context*. J. Exp. Med., Vol. 181: 247-255.
- Park J. Isaacs R., Chien P., Schreiber A. (1993). *In the absence of other Fc receptors, Fc gamma RIIIA transmits a phagocytic signal that requires the cytoplasmic domain of its gamma subunit*. J. Clin. Invest. 92: 1967-1973.
- Pignata C., Prasad K., Robertson M., Levine H., Rudd C., Ritz J. (1993). *FcγRIIIA-mediated signaling involves src-family lck in human natural killer cells*. J. Immunology, Vol. 151: 6794-6800.
- Pleiman C., D'Ambrosio D., Cambier J. (1994a). *The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction*. Immunol. Today, Vol. 15: 393-398.
- Pleiman C., Abrams C., Timson L., Bedzyk W., Jongstra J., Shaw A., Cambier J. (1994b). *Distinct p53:56<sup>bn</sup> and p59<sup>gn</sup> domains associate with nonphosphorylated and phosphorylated Ig-α*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91: 4268-4272.
- Pribluda V., Pribluda C., Metzger H. (1994). *Transphosphorylation as the mechanism by which the high-affinity receptor for IgE is phosphorylated upon aggregation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91: 11246-11250.
- Qu Z., Lieber J.M., Powers M.R., Galey T., Ahmadi P., Huang X.N., Ansel J.C., Butterfield J.H., Planck S.R., Rosenbaum J.T. (1995). *Mast cell are the major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma*. Am. J. Pathol. 147: 564-573.
- Ra C., Jouvin M., Blank U., Kinet J. (1989). *A macrophage Fcγ receptor and the mast cell receptor for IgE share an identical subunit*. Nature, Vol. 341: 752-754.
- Ravetch J., Anderson C. (1990). *FcγR family: proteins, transcripts, and genes*. En: Fc receptors and the action of antibodies. American Society for Microbiology, 211-235.

- Ravetch J., Kinet J. (1991). *Fc receptors*. Ann. Rev. Immunol. 9: 457-492.
- Razin E., Pecht I., Rivera J. (1995). *Signal transduction in the activation of mast cells and basophils*. Immunol. Today Vol. 16: 370-373.
- Reth M. (1989). *Antigen receptor tail clue*. Nature 338: 383-384.
- Reth M. (1992). *Antigen receptors on B lymphocytes*. Ann. Rev. Immunol. 10: 97-121.
- Rivera V., Brugge J. (1995). *Clustering of Syk is sufficient to induce tyrosine phosphorylation and release of allergic mediators from rat basophilic leukemia cells*. Mol. Cell. Biol. Vol. 15: 1582-1590.
- Romeo C., Amiot M., Seed B. (1992). *Sequence requirements for induction of cytotoxicity by the T cell antigen/Fc receptor  $\zeta$  chain*. Cell, Vol. 68: 889-897.
- Rosales C., Brown E. (1991). *Two mechanisms for IgG Fc-receptor-mediated phagocytosis by human neutrophils*. J. Immunol. , Vol. 146: 3937-3944.
- Sanchez M., Musulovin Z., Burkhardt A., Mahahan S., Costa T., Franke R., Bolen J., Nussenzweig M. (1993). *Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig $\alpha$  and Ig $\beta$* . J. Exp. Med., Vol. 178: 1049-1055.
- Sandor M., Lynch R. (1993). *Lymphocyte Fc receptors: the special case of T cells*. Immunol. Today, Vol. 14: 227-231.
- Santana C., Noris G., Ortega E. (1996). *Protein tyrosine phosphorylation in Fc $\gamma$  receptor signaling*. J. of Leuk. Biol. En impresion.
- Scholl P., Geha R. (1993). *Physical association between the high-affinity IgG receptor (Fc $\gamma$ RI) and the  $\gamma$  subunit of the high-affinity IgE receptor (Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ )*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 90: 8847-8850.
- Shen Z., Lin C., Unkeless J. (1994). *Correlations among tyrosine phosphorylation of Shc, p72<sup>syk</sup>, PLC-gamma1, and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> flux in Fc gamma RIIA signaling*. J. Immunol. 152: 3017-3023.
- Skolnik E., Batzer A., Li N., Lowenstein E., Mohammadi M., Margolis B., Schlessinger J. (1993). *The function of GRB2 in linking the insulin receptor to ras signaling pathways*. Science, Vol. 260: 1953-1955.



- Stephan V., Benhamou M., Gutkind S., Robbins K., Siraganian R. (1992). *FcεRI-induced protein tyrosine phosphorylation of pp72 in rat basophilic leukemia cells (RBL-2H)*. J. Biol. Chem., Vol. 267 (8): 5434-5441.
- Taniguchi T. (1995). *Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases*. Science, Vol. 268: 251-255.
- Timson L., Kong T., Samelson L., Shaw A. (1992). *p59<sup>lck</sup> tyrosine kinase associates with multiple T-cell receptor subunits through its unique amino-terminal domain*. Mol. Cell. Biol., Vol. 12: 5438-5446.
- Ting A., Dick C., Shoon R., Karnitz L., Abraham R., Leibson P. (1995). *Fcγ receptor activation induces the tyrosine phosphorylation of both phospholipase C (PLC)-γ1 and PLC-γ2 in natural killer cells*. J. Biol. Chem. Vol. 170: 16415-16421.
- Veillette A., Bookman M., Horak E., Bolen J. (1988). *The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56<sup>lck</sup>*. Cell, Vol. 55: 301-308.
- Vivier E., Marin P., O'Brien C., Bruker B., Schossman S., Anderson P. (1991). *Tyrosine phosphorylation of the FcγRIII (CD16):ζ complex in human natural killer cells*. J. Immunol., Vol. 146: 206-210.
- Wang B., Rieger A., Kilgus O., Ochiai K., Maurer D., Födinger D., Kinet J., Sting G. (1992). *Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via FcεRI*. J. Exp. Med., Vol 175: 1353-1365.
- Wange R., Kong T., Samelson L. (1992). *A tyrosine-phosphorylated-70-kDa protein binds a photoaffinity analogue of ATP and associates with both the ζ chain and CD3 components of the activated T cell antigen receptor*. J. Biol. Chem., Vol. 267: 11685-11688.
- Wange R., Malek S., Desiderius S., Samelson L. (1993). *Tandem SH2 domains of ZAP-70 bind to T cell antigen receptor ζ and CD3ε from activated Jurkat T cells*. J. Biol. Chem., Vol 268: 19797-19801.
- Weber J., Bell G., Young M., Pawson T., Imboden J. (1992). *Association of the tyrosine kinase LCK with phospholipase C-γ1 after stimulation of the T cell antigen receptor*. J. Exp. Med., Vol. 176: 373-379.

- Weiss A. (1993). *T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinase*. Cell, Vol. 73: 209-212.
- Wilson B.S., Kapp N., Lee R.J., Pfeiffer J.R., Martinez A.M., Platt Y., Letourner F., Oliver J.M. (1995). *Distinct functions of the Fc epsilon R1 gamma and beta subunits in the control of Fc epsilon-mediated tyrosine kinase activation and signaling responses in RBL-2H3 mast cells*. J. Biol. Chem., 270: 4013-4022.
- Williams G., Peaker C., Patel K., Neuberger M. (1994). *The  $\alpha/\beta$  sheath and its cytoplasmic tyrosines are required for signaling by the B-cell antigen receptor but not for capping or for serine/threonine-kinase recruitment*. Proc. Natl Acad. Sci. USA., Vol. 91: 474-478.
- Yamashita T., Mao S., Metzger H. (1994). *Aggregation of the high-affinity IgE receptor and enhanced activity of p53/56<sup>lyn</sup> protein tyrosine kinase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91: 11251-11255.
- Young J., Ko S., Cohn Z. (1984). *The increase in intracellular free calcium associated with IgG gamma 2b/gamma 1 Fc receptor- ligand interactions: role in phagocytosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5430-5434.
- Ziemiecki A., Harpur A., Wilks A. (1994). *JAK protein tyrosine kinases: Their role in cytokine signaling*. Trends in Cell Biol., Vol 4: 207-1-211.

## APENDICE I

### REACTIVOS

GIBCO:

MEM  
FCS

PIERCE:

Gelcode:

SIGMA:

5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (Sigma Fast BCIP/NBT Insoluble Alkaline Phosphatase Substrate)

Estreptomina

p-Nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D- Glucosaminida

Penicilina G

Tritón X-100

ZYMED:

AP- Rabbitt  $\alpha$ - Mouse IgG (H - L)

Anti- Phosphotirosine Monoclonal Antibodie (Developed in mouse) PY20

FITC-Goat- $\alpha$ -Mouse IgG (H+L)

## APENDICE II

### AMORTIGUADORES, MEDIOS Y SOLUCIONES

#### Solución de trabajo Tyrode

NaCl	130 mM
KCl	5 mM
KCl <sub>2</sub>	1.4 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Glucosa	5.6 mM
Hepes	10 mM
BSA	0.1 %

pH 7.4-7.6

#### Glicina 0.2 M

Glicina	3.0028 g
Agua bidestilada, c.s.	200 ml

pH 10.7

#### Tritón 1 %

Tritón X-100	1 ml
Agua bidestilada, c.s.	100 ml

#### Tritón 0.5 %

Tritón al 1%	50 %
Solución de trabajo Tyrode	50 %

#### Cocktail $\beta$ -hexosaminidasa

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.507 g
Agua bidestilada	35 ml

Ajustar pH a 4.5 con ácido cítrico 0.4 M ( $\approx$  35 ml)  
A 30 ml de la solución anterior, añadir 45 ml de agua bidestilada.  
Disolver 100 mg de p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D- glucosaminida.  
Almacenar en alicuotas a -20°C.

#### Acido cítrico 0.4 M

Ac. cítrico 8.4058 g  
Agua bidestilada, c.s. 100 ml

#### Amortiguador de boratos

Ac. bórico 12.3688 g  
NaCl 8.775 g  
Agua bidestilada, c.s. 1 lt  
pH 8.5

#### PBS

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.36 g  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.1 g  
NaCl 8.75 g  
Agua bidestilada, c.s. 1 lt  
pH 7.2- 7.4

#### Tris- HCl 0.125 M

Trizma base 3.784 g  
Agua bidestilada, c.s. 250 ml  
pH 9.5

#### PBS - BSA 1 %

BSA 1 %  
Disolver en PBS

#### Amortiguador de dietanolamina al 10 %

Dietanolamina 100 ml  
 $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  102 mg  
 $\text{NaN}_3$  0.4 g  
Agua bidestilada, c.s. 1 lt  
Ajustar pH a 9.8 con HCl concentrado. Cubrir de la luz.

### Sustrato de fosfatasa alcalina

p-nitrofenil fosfato disódico 10 mg  
Amortiguador de dietanolamina 10 ml

### DGVB<sup>2+</sup>

Gelatina 0.25 g  
Barbital 0.46 g  
NaCl 4.3 g  
Dextrosa 12.5 g  
CaCl<sub>2</sub> 1M 0.5 ml  
MgCl<sub>2</sub> 1M 0.75 ml  
Agua bidestilada, c.s. 500 ml  
pH 7.5

Esterilizar por filtración con membrana GS 0.22 μM (Millipore)

### Medio MEM

MEM 1 sobre/1 lt  
NaHCO<sub>3</sub> 2.2 g  
Agua desionizada, aforar a 1 lt

Esterilizar por filtración con membrana GS 0.22 μM (Millipore)

### MEM suplementado

Medio MEM 88 %  
Suero fetal bovino 10 %  
Antibióticos 100 X 1 %  
Glutamina 100 X 1 %

### Antibióticos 100 X (100 000 u/ml de penicilina G y 1 mg/ml de estreptomicina)

Penicilina G 598.8 mg  
Estreptomicina 100 mg  
PBS, c.s. 100 ml

Esterilizar por filtración con membrana GS 0.22 μM (Millipore)

### Glutamina 100 X (0.2 M)

Glutamina	2.922 mg
PBS caliente, c.s.	100 ml
Esterilizar por filtración con membrana GS 0.22 $\mu$ M (Millipore)	

### NaOH 2 N

NaOH	80 g
Agua bidestilada, c.s.	1 lt

### Cloramina T

Cloramina T	3 mg
Agua bidestilada	1 ml

### Bisulfito de sodio

Bisulfito de sodio	3 mg
Agua bidestilada	1 ml

### Acido tricloroacético al 10 %

Acido tricloroacético	10 g
Agua bidestilada, c.s.	100 ml

### Buffer de muestra reductor

Trizma base	1.52 g
Glicerol	20 ml
SDS	2 g
$\mu$ -mercaptoetanol	2 ml
Azul de bromofenol	1 mg
Agua bidestilada, c.s.p.	100 ml
Ajustar pH a 6.8 con HCl	

#### PBS - Tween 0.1 %

Tween 20	1 ml
PBS	1 lt

#### Acrilamida - Bis

Acrilamida	30 g
Bis Acrilamida	0.8 g
Agua bidestilada, c.s.	100 ml

#### Amortiguador gel separador

Trizma base	1.5 M
SDS	0.4 %
Ajustar pH a 8.8 con HCl	

#### Amortiguador gel concentrador

Trizma base	0.5 M
SDS	0.04 %
Ajustar pH a 6.8 con HCl	

#### Amortiguador de corrida

Glicina	14.48 g
Trizma base	3 g
SDS	1 g
Agua bidestilada, c.s.	1 lt
No ajustar pH	

#### Azul Coomassie

Agua bidestilada	50 %
Metanol	40 %
Acido acético	10 %
Azul de Coomassie	0.1 %

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



### Solución desteñidora

Etanol	30 %
Acido acético	7 %
Agua bidestilada	43 %

### Amortiguador de transferencia

Trizma base	3
Glicina	14,48 g
Metanol	200 ml
Agua bidestilada, c.s.p.	1 lt
No ajustar pH	
Debe estar frío	

### Solución para fijar geles

Etanol	50 %
Acido acético	5 %
Agua bidestilada	45 %

### PBS - BSA 3 % (Solución de blanqueo para blot anti-PY)

BSA	3 %
Disolver en PBS	

### PBS-BSA 0,1 % (Solución de bloqueo para FACS)

BSA	0,1 %
Disolver en PBS	

### PBS-BSA- Azida (Solución de bloqueo para FACS)

BSA	0,1 %
Azida	0,1 %
Disolver en PBS	

### PFA 1 %

Colocar en un matraz 0.5 mg de paraformaldehído (PFA).

Adicionar 25 ml de agua bidestilada.

Calentar suavemente. Agitar con una mosca.

Añadir 1 ó 2 gotas de NaOH 1 M, para que la solución quede transparente.

Agregar 22.5 ml de agua y 2.5 ml de PBS 20 X.

Ajustar pH a 7.4. Guardar en refrigeración.

### PBS 20 X

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  7.2 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidro 22 g

NaCl 175 g

Agua bidestilada, c.s. 1 lt

Ajustar el pH a 7.5 con lentejas de NaOH