

199



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LAS VIAS BIOQUIMICAS IMPLICADAS EN LA TRANSDUCCION DE SEÑALES MEDIADA POR RECEPTORES FCγ

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
PAULA GUADALUPE SANTOYO RAMOS

DIRECTOR: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

MEXICO, D.F.

2002



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Estudio de las vías bioquímicas implicadas en la transducción  
de señales mediada por Receptores Fc gama"

realizado por Paula Guadalupe Santoyo Ramos

con número de cuenta 9550395-6 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Propietario

Propietario

Suplente

Suplente

Dr. Enrique Ortega Soto

Dr. Edmundo Lamoyi Velázquez

Dra. Gloria Soldevila Margarejo

Dra. Isabel Soto Cruz

M en IBB. Saúl Cano Colín

Consejo Departamental de Biología

Dra. Patricia Ramos Morales

FACULTAD DE CIENCIAS  
U. N. A. M.



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

Este trabajo,  
**“Estudio de las vías bioquímicas implicadas en la transducción de  
señales mediada por Receptores Fc $\gamma$ ”**

fue dirigido por el Dr. Enrique Ortega Soto con asesoría técnica de la  
QFB. Claudia Angélica Garay Canales  
y realizado en el departamento de Inmunología  
en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de  
la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se realizó con el apoyo del proyecto  
de DGAPA-UNAM, PAPIIT IN 208399 e IN 213701  
y el proyecto 31783-N de CONACYT, México

El jurado designado para este examen esta compuesto por:

Dr. Edmundo Lamoyi Velázquez

Dra. Gloria Soldevilla Melgarejo

Dra. Isabel Soto Cruz

M. en IBB. Saúl Cano Colín

Dr. Enrique Ortega Soto

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente al Dr. Enrique Ortega Soto por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y brindarme su asesoría, comprensión y tolerancia para la realización de este trabajo.

De igual manera a mis sinodales Dr. Edmundo Lamoyi Velázquez, Dra. Gloria Soldevilla Melgarejo, Dra. Isabel Soto Cruz y al M. en IBB. Saúl Cano Colín por todos sus comentarios sobre este trabajo.

A todos mis profesores en la Facultad de Ciencias que compartieron conmigo sus conocimientos sobre la ciencia y sus encantos.

Pero particularmente, a la Dra. Hortencia Gonzalez por contribuir en mi formación académica y por todo su apoyo. A Enrique y David por mostrarme los compromisos que conlleva una neurona viva. A la Dra. María Esther Murillo por enseñarme a organizar mi vida.

A Claudia Garay por enseñarme a jugar con la "agüitas". A Claudia Hallal por alegrarme la tarde con su melodiosa voz, a Martha por que si , a Armida por todos sus consejos, y a José por que sin el la vida en el laboratorio sería aburrida.

A Jacqueline por que siempre ha estado ahí.

A Paloma, Arela, Mónica y Ana por su amistad.

A mis hermanos por que si.

Especialmente a Rebeca por todo su amor, apoyo y paciencia.

A mis abuelos con mi cariño y respeto les dedico este trabajo, por que lo que soy se lo debo a ellos.

εν πασι γαρ τοις φυσικοις ενεστι τι θαυμαστον  
En todas las cosas de la naturaleza hay algo de maravilloso

Aristóteles

## **INDICE**

|  |    |
|--|----|
| Resumen  | I  |
| I. Antecedentes  | 1  |
| II. Introducción   | 6  |
| II.1 El sistema fagocítico mononuclear, origen y características   | 6  |
| II.1a Células del sistema fagocítico mononuclear   | 8  |
| II.1b Funciones de los macrófagos en la respuesta inmune   | 9  |
| II.2 Los receptores para inmunoglobulinas, características y funciones   | 10 |
| II.2a Inmunoglobulinas   | 10 |
| II.2b Los Receptores Multicadena de Reconocimiento Inmunne   | 18 |
| II.2c Características moleculares de los receptores para<br>Inmunoglobulinas   | 21 |
| II.2d Receptores para inmunoglobulina clase G  | 21 |
| II.3 Señales bioquímicas iniciadas por la agregación de los FcR  | 26 |
| II.3a Señalización intracelular inducida por la agregación de<br>los FcR que conduce a la fagocitosis                                  | 29 |
| II.3b La Fosfolipasa D en la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R   | 30 |
| II.3c La fosfatidilinositol 3-cinasa y su papel en la señalización inducida<br>por el entrecruzamiento de los Fc $\gamma$ R            | 33 |
| II.3d La cinasa regulada por señales extracelulares, ERK, y su papel en la<br>señalización inducida por el entrecruzamiento de los FcR | 36 |
| II.3e La proteína Cinasa C y su papel en la fagocitosis  | 39 |
| II.4 Uso de inhibidores enzimáticos para la investigación de las vías de   |    |

|  |    |
|--|----|
| transducción de señales  | 41 |
| III. Justificación   | 44 |
| IV. Hipótesis  | 46 |
| V. Objetivos   | 46 |
| VI. Materiales Y Métodos   | 47 |
| VII. Resultados  | 56 |
| VII.1 La fagocitosis de eritrocitos opsonizados con el anticuerpo<br>2C5 es menor que la fagocitosis de eritrocitos opsonizados<br>con el anticuerpo 4F8 | 56 |
| VII.2 La inhibición de la enzima PLD disminuye en aproximadamente<br>20% la fagocitosis inducida por ambas subclases                                     | 59 |
| VII.3 La inhibición de la enzima PI3K tiene distinto efecto sobre la<br>fagocitosis inducida por cada anticuerpo   | 62 |
| VII.4 La actividad de las enzimas MEK1/2 es necesaria durante<br>la fagocitosis inducida por ambas subclases   | 64 |
| VII.5 La inhibición de la actividad de PKC disminuye de manera dosis<br>dependiente la fagocitosis inducida por ambos anticuerpos                        | 68 |
| VII.6 La fagocitosis inducida por el anticuerpo 2C5 depende de la actividad<br>de las isoformas nuevas de las enzimas de la familia PKC                  | 71 |
| VIII. Discusión  | 72 |
| IX. Conclusiones   | 83 |
| X. Referencias Bibliográficas  | 84 |



## RESUMEN

Uno de los principales mecanismos efectores involucrados en eliminar a agentes infecciosos es la fagocitosis mediada por los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas clase G, los Fc $\gamma$ R. Los Fc $\gamma$ R reconocen el dominio constante 2 de la cadena pesada de las inmunoglobulinas clase G, el C $\mu$ 2; que forma parte de la porción Fc. Por otra parte, las inmunoglobulinas clase G (IgG) se unen a través de su porción que reconoce al antígeno, el Fab, a la partícula para marcarla como blanco para ser fagocitada. Los Fc $\gamma$ R, aún cuando no tienen actividad intrínseca de cinasa, cuando son agregados pueden desencadenar una cascada de señales bioquímicas. Estas señales se dan por la actividad de enzimas citoplasmáticas de la familia de Src que son reclutadas a la vecindad de los agregados del receptor. Se ha reportado que enzimas de la familia Syk-ZAP70, de la familia PKC, y otras como PI3K, ERK, PLA $_2$ , PLC $\gamma$ 1, PLD son activadas durante la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R. Si bien se sabe que la agregación de Fc $\gamma$ R es el evento que inicia la cascada bioquímica de activación, el mecanismo por el cual ésto ocurre no se conoce aún. Hay resultados que apoyan la idea de que no hay una relación simple entre el número de receptores agregados y la respuesta efectora, sino que hay otros factores, dinámicos, de estructura y conformación de los agregados de receptores, que determinan la respuesta.

Para estudiar la activación de macrófagos inducida por la agregación de los Fc $\gamma$ R, se generaron anticuerpos monoclonales específicos para el 2,4-dinitrofenol, pertenecientes a varias subclases de las inmunoglobulinas clase G. Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que eritrocitos opsonizados con estos anticuerpos eran fagocitados con distinta eficiencia, dependiendo de la subclase de IgG del anticuerpo opsonizante. A pesar de que, la constante de afinidad de los anticuerpos para la unión por el hapteno es similar ( $K_a \cong 4 \times 10^6$ ); y que el análisis de la unión del eritrocito opsonizado (Ig) a la célula fagocítica no mostró diferencias significativas. Nosotros proponemos que los agregados que forman estas inmunoglobulinas son distintos y se traducen en diferencias cualitativas y cuantitativas al activar a distintas enzimas, generando las diferencias observadas en la fagocitosis. Para analizar nuestra hipótesis empleamos inhibidores de enzimas involucradas en la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R. Nuestros resultados demuestran que la actividad de PLD, ERK1/2, PI 3-K y PKC son necesarias para que se lleve a cabo la fagocitosis de eritrocitos opsonizados por cada subclase. Sin embargo, la fagocitosis de cada uno tiene distinta dependencia por cada enzima analizada. Los resultados más contrastantes se dieron al analizar el papel de las cinasas de la familia PKC.

Dado que estos anticuerpos sólo difieren en el subtipo de IgG al que pertenecen, las diferencias importantes entre ellos radican en la zona de la bisagra. Las características de esta zona definen la flexibilidad de la molécula. Esto podría ser un factor importante durante la interacción del anticuerpo con su receptor. Nuestro trabajo comprueba que las diferencias en la eficiencia con que los anticuerpos de distinta subclase median la fagocitosis, se deben a que cada subclase de IgG induce de manera cualitativa y cuantitativamente diferente, la activación de las enzimas involucradas en la fagocitosis. Estas diferencias podrían estar relacionadas con las características de los agregados de los receptores formados por cada anticuerpo.

## I. ANTECEDENTES

La capacidad de muchos receptores para transducir señales depende que presenten actividad enzimática intrínseca, es decir, que sean proteínas transmembranales que puedan tanto unir al ligando a través de su porción extracelular, como iniciar una señal bioquímica intracelular que conduzca a una respuesta celular (Alberts, 1994). Existen otros receptores que no presentan actividad enzimática alguna, pero que al unir a su ligando activan enzimas citoplasmáticas (Ravetch, 1991). Un ejemplo de ellos son los Receptores Multicadena de Reconocimiento Inmune que participan en procesos involucrados con el funcionamiento del sistema inmunológico. De estos receptores se sabe que con la unión de su ligando son agregados y que esto inicia una señal bioquímica (Ravetch, 1991). Para comprender como la sola agregación induce la activación del receptor, se deben definir las propiedades estructurales y/o cinéticas de los agregados del receptor, las características de los complejos proteicos formados como consecuencia de esta agregación y el papel de estos agregados en la transducción de señales.

Durante el estudio de las respuestas celulares inducida por la agregación de estos receptores se han empleado anticuerpos monoclonales específicos para estimular a cada receptor. Esto ha permitido descifrar parte de las cascadas bioquímicas generadas y los requerimientos mínimos para activar a la célula. También se ha podido confirmar que cualquier ligando que sea capaz de inducir la agregación de los receptores induce señales que generan respuestas celulares.

Sin embargo, aún no logramos entender cómo el mismo receptor puede inducir distintas respuestas celulares, ni cómo las diferencias que puedan existir entre estos agregados (por ejemplo, en cuanto a su estructura, tamaño, vida media, etc) afectan el proceso. Una posible respuesta es la hipótesis mecánica, la cual enfatiza la relevancia de

la configuración espacial de los agregados del receptor para inducir la activación celular (Pecht, 1989). Algunos resultados experimentales apoyan esta hipótesis:

La respuesta de linfocitos B al estimular el receptor de antígeno del linfocito B, el BCR, usando el antígeno, anticuerpos anti-inmunoglobulina (Ig) o anticuerpos anti-Ig unidos a fase sólida fue distinta (Manger, 1987; Brunswick, 1989; Pleiman, 1994). Asimismo, la estimulación del Receptor de antígeno del linfocito T, el TCR, usando distintos anticuerpos que reconocieran a una de las subunidades del TCR, la cadena CD3, indujo respuestas diferentes que casi se igualaron al entrecruzar estos anticuerpos con un segundo anticuerpo que los reconociera (Jeddi-Tehrani, 1992). De la misma forma, la estimulación del Receptor para la porción Fc de la inmunoglobulina clase E, el Fc $\epsilon$ RI, usando distintos anticuerpos anti-Fc $\epsilon$ RI, indujo distintas respuestas que se igualaron a la respuesta generada por el antígeno si se usaban fragmentos Fab de estos anticuerpos para generar dímeros del receptor y después estos eran agregados al entrecruzar usando un segundo anticuerpo (Ortega, 1988). Estos anticuerpos compiten por el sitio de unión para IgE en la cadena  $\alpha$  del receptor e inducen la formación de dímeros del Fc $\epsilon$ RI, que son capaces de mediar la secreción de enzimas contenidas en gránulos de secreción. Sin embargo, cada anticuerpo indujo la secreción con distinta eficiencia (Ortega, 1988). Esta relación no es exclusiva para la secreción de esta enzima, pues también se observó al determinar la cantidad de ácido araquidónico y leucotrieno C<sub>4</sub> liberado en respuesta a los mismos anticuerpos (Ortega, 1989). ¿Cómo explicar este fenómeno?

Hay dos posibles respuestas a esta pregunta. La primera es que cada anticuerpo induzca distinto número de dímeros de receptores Fc $\epsilon$ RI, y la segunda que los dímeros formados por cada anticuerpo tengan una organización distinta en la membrana, la cual afecta su capacidad de inducir secreción. La primera posibilidad se probó calculando,

matemáticamente, la proporción de dímeros inducida por cada anticuerpo y se concluyó que el grado de dimerización inducido por cada anticuerpo no explicaba las diferencias observadas (Ortega, 1988). Al analizar la movilidad rotacional de los complejos anticuerpo-Fc $\epsilon$ RI formados por cada anticuerpo sobre la membrana de la célula, se determinó que existe una relación inversa entre la movilidad del complejo Fc $\epsilon$ RI-anticuerpo anti-Fc $\epsilon$ RI y la secreción de mediadores; es decir, los anticuerpos que presentaron mayor movilidad rotacional fueron los menos eficientes para inducir secreción (Pecht, 1991). Estos datos sugieren que las diferencias observadas en los ensayos de secreción se deben a que la organización de los dímeros de Fc $\epsilon$ RI formados por cada anticuerpo es distinta.

Las diferentes respuestas se deben a que los dímeros inducidos por cada uno de los anticuerpos tienen diversas eficiencias para activar diversas vías de señalización involucradas en la síntesis de inositol 1,4,5- trifosfato, la movilización de Ca<sup>2+</sup> y la formación de puntos de adhesión focal. El análisis de las respuestas bioquímicas inducidas por estos anticuerpos revelaron un paso de regulación en las señales inducidas por el Fc $\epsilon$ RI desconocido hasta ese momento. Este paso de regulación involucra la disociación de la cinasa Lyn de los complejos de los receptores agregados (Ortega, 1999).

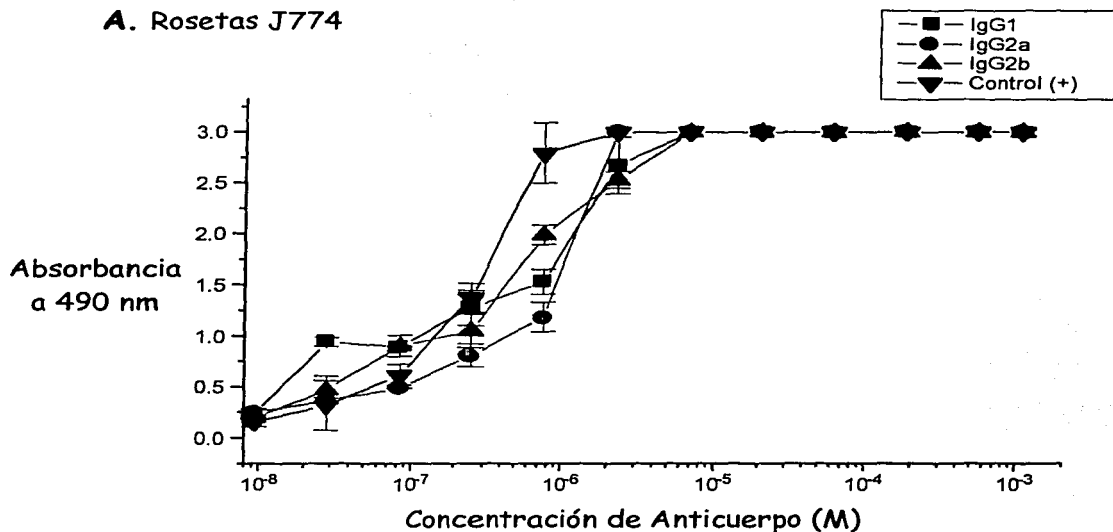
Estos resultados apoyan la idea de que no hay una relación simple entre el número de receptores agregados y la respuesta efectora, sino que otros factores (diferencias de conformación del agregado y/o de orientación de las subunidades de los receptores entre sí, así como dinámicos) determinan la respuesta.

Bajo esta premisa, para estudiar la activación a través de receptores para IgG, se generaron anticuerpos monoclonales específicos para el 2,4-dinitrofenol, pertenecientes a varias subclases de inmunoglobulina clase G. Al caracterizar la capacidad de estos anticuerpos para inducir funciones efectoras en células de la línea monocítica, se encontró

que los anticuerpos de cada subclase mediaban, con distinta eficiencia, la fagocitosis de eritrocitos opsonizados (Fig. 1). La capacidad de los anticuerpos de la subclase IgG1 para mediar fagocitosis es tres veces menor que la de anticuerpos de la subclase IgG2b. Esto no obstante que la constante de afinidad de los anticuerpos de ambas subclases para la unión del hapteno es similar ( $K_a \cong 4 \times 10^6$ ). Por otra parte, los resultados obtenidos en ensayos de rosetas, donde se determina la interacción entre el eritrocito opsonizado (Ig) y la célula fagocítica (receptor de Ig), los distintos anticuerpos no mostraron diferencias significativas (Fig. 1)(Garay, 1994).

Las diferencias entre estos dos anticuerpos para inducir fagocitosis no pueden explicarse basándose en las diferencias de unión entre la inmunoglobulina y el receptor, o entre la inmunoglobulina y el hapteno. Nosotros proponemos que los agregados Ig-Receptores que forman estas inmunoglobulinas tienen diferencias estructurales, las cuales pueden traducirse en diferencias cualitativas y cuantitativas en la activación de distintas enzimas, generando las diferencias observadas en la fagocitosis. Este trabajo se enfoca a analizar esta hipótesis.

### A. Rosetas J774



### B. Fagocitosis J774

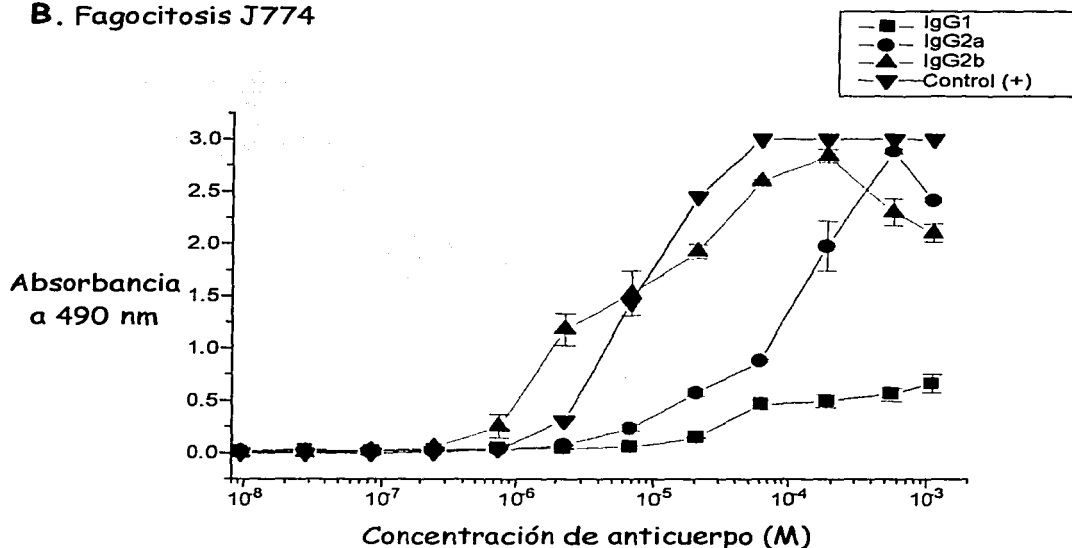


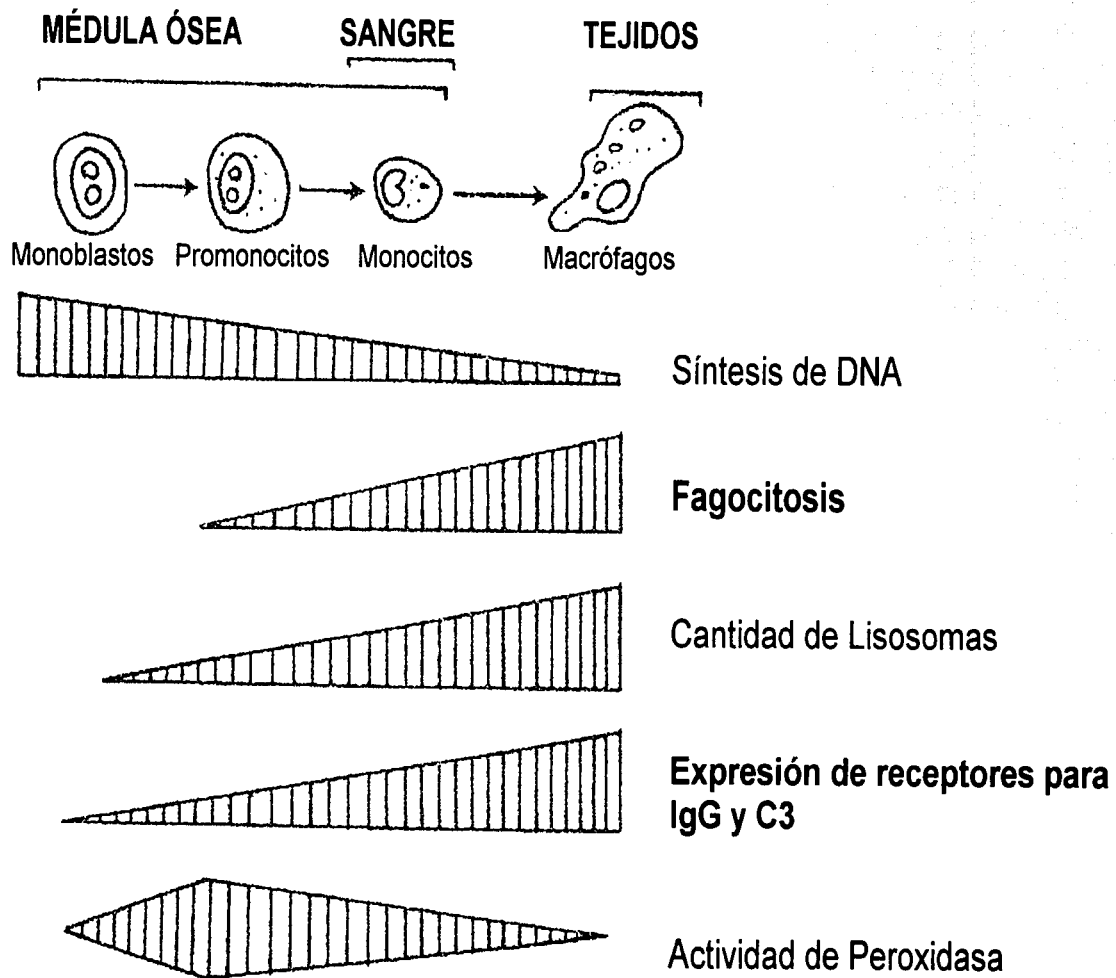
Fig. 1. Formación de Rosetas y Fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados con anticuerpos anti-DNP de distinta subclase de IgG. Los eritrocitos de carnero se opsonizaron con anticuerpos de distinta subclase de IgG (■, ●, ▲). Los anticuerpos se utilizaron en diluciones crecientes para opsonizar los eritrocitos de carnero. Como control positivo se utilizó IgG purificada de suero policlonal de conejo anti-DNP (▼). Los eritrocitos opsonizados fueron incubados 60 minutos con macrófagos J774 a 4°C (Rosetas) ó a 37° C (Fagocitosis). Después de (A) lavar los eritrocitos no adheridos, o (B) lisar los eritrocitos no ingeridos; se lisaron las células J774 y se determinó la formación de rosetas o fagocitosis por el método de Jungi (Garay, 1994).

## II. INTRODUCCIÓN

### II.1 EL SISTEMA FAGOCÍTICO MONONUCLEAR, ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS

El macrófago es la principal célula diferenciada del sistema fagocítico mononuclear; este sistema comprende monoblastos de la médula ósea y promonocitos de la médula ósea y sangre, monocitos de sangre periférica y macrófagos tisulares. Los macrófagos están ampliamente distribuidos en todo el cuerpo (Auger, 1992). Durante la etapa embrionaria se originan en el saco vitelino (Moore, 1970), pero en el adulto se originan en la médula ósea (Van-Furth, 1989). En la médula ósea se encuentran macrófagos residentes y sus precursores: monocitos, promonocitos y monoblastos. Estas células tienen un progenitor en común con los neutrófilos en la médula ósea (Metcalf, 1971) (Fig. 2), que se conoce como unidad formadora de colonias granulocito-macrófago (CFU-GM, por sus siglas en inglés).

Las células del sistema fagocítico mononuclear tienen características fenotípicas diferentes que permiten distinguirlas, como su morfología y capacidad fagocítica; contenido de enzimas hidrolíticas y expresión de receptores en membrana (Auger, 1992) (Fig. 2). Durante la diferenciación, el metabolismo de los fagocitos mononucleares sufre alteraciones importantes. En los siguientes párrafos revisaremos algunas de las características de las células de este sistema.



**Fig. 2. El sistema fagocítico mononuclear.** En el esquema se muestra el origen y algunas características de las células del sistema fagocítico mononuclear. (Lewis, 1992).



## **II.1a Células del sistema fagocítico mononuclear**

El monoblasto es la célula menos diferenciada del sistema fagocítico mononuclear. El monoblasto al dividirse da lugar al promonocito (que es el precursor directo de los monocitos), estas células contienen lisozima y esterasa no específica, gránulos de peroxidasa y expresan receptores para IgG y para el componente C3 del complemento. Los promonocitos pueden fagocitar eritrocitos recubiertos por IgG y bacterias opsonizadas, pero la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con C3b es relativamente pobre (Van-Furth, 1980). Los promonocitos al dividirse dan origen a los monocitos. Los monocitos permanecen probablemente en la médula ósea por al menos 24 horas, antes de entrar al torrente sanguíneo (Van-Furth, 1986) (Fig. 2).

Los monocitos se observan al microscopio óptico como células pequeñas de 12-15  $\mu\text{m}$  de diámetro; con un núcleo reniforme que ocupa el 50 % del área de la célula. La migración de los monocitos de sangre periférica a los tejidos extravasculares involucra su adhesión al endotelio, la migración entre las células endoteliales y la subsecuente migración entre las estructuras subendoteliales. Al arribar al órgano blanco, los monocitos se diferencian a macrófagos y permanecen en los tejidos por varios meses (Furth, 1968). Durante la transición de monocito a macrófago, hay un aumento en el número de mitocondrias, en la actividad de las enzimas mitocondriales, en la tasa de respiración celular, en el número de lisosomas y en las enzimas lisosomales (Auger, 1992).

Los macrófagos se observan al microscopio como células grandes de 25-50  $\mu\text{m}$  de diámetro. Presentan un núcleo excéntrico redondo o arrañonado con uno o dos nucleolos prominentes y el complejo de Golgi yuxtannuclear (Auger, 1992).

### **II.1b Funciones de los macrófagos en la respuesta inmune**

Los fagocitos mononucleares defienden al organismo contra una gran variedad de agentes infecciosos como bacterias, virus, protistas y hongos. Las células son atraídas al foco de infección por componentes bacterianos, endotoxinas, componentes del complemento, complejos inmunes, quimiocinas y fragmentos de colágena; y permanecen en esa zona bajo la influencia del factor inhibidor de la migración secretado por los Linfocitos T (Metchnikoff, 1905; Scott, 1993).

Los fagocitos mononucleares participan en la respuesta inmune innata, parte de las primeras defensas del organismo contra agentes infecciosos. Además, estas células también están involucradas en regular la respuesta del sistema inmunológico adaptativo, a través del procesamiento y presentación de antígenos, de la secreción de una gran variedad de mediadores proinflamatorios y de citocinas inmonoreguladoras, formando así un puente entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adquirida.

Los macrófagos tienen la capacidad de internalizar a estos agentes infecciosos a través de un proceso llamado fagocitosis. La internalización inicia con el reconocimiento de moléculas presentes en la superficie del microorganismo, a través de receptores de membrana del macrófago. Estas moléculas son reconocidas directamente por los

macrófagos, como ocurre con la interacción de el receptor de manosa con residuos de carbohidratos en la superficie del microorganismo; o indirectamente, como ocurre con las opsoninas opsoninas (como son las inmunoglobulinas, o anticuerpos, y los fragmentos de componentes del complemento) que se unen específicamente a la superficie del patógeno y son reconocidas por el macrófago a través de receptores de membrana. (Greenberg, 1993). La fagocitosis implica la internalización de partículas relativamente grandes ( $>0.5 \mu\text{m}$ ) por mecanismos que involucran el rearrreglo del citoesqueleto (Aderem, 1999).

## **II.2 LOS RECEPTORES PARA INMUNOGLOBULINAS, CARACTERÍSTICAS Y FUNCIONES**

### **II.2a Inmunoglobulinas.**

Las inmunoglobulinas (anticuerpos) son moléculas importantes del sistema inmunológico, pueden inactivar a toxinas y virus y relacionar a la inmunidad humoral del sistema inmunológico específico con las células efectoras del sistema inmunológico innato (Sánchez-Mejorada, 1998).

Las inmunoglobulinas están compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas que se mantienen unidas a través de múltiples interacciones no covalentes y son estabilizadas por puentes disulfuro. El tetrámero tiene dos cadenas pesadas idénticas entre sí y dos cadenas ligeras igualmente idénticas. Cada cadena se pliega en una serie de dominios compactos (dominios de inmunoglobulina) de estructura similar.

Estos dominios resisten la actividad de proteasas. Los residuos de aminoácidos situados entre cada dominio están más expuestos y son susceptibles a proteólisis; su digestión genera distintos fragmentos que conservan actividad biológica después de una proteólisis controlada (Carayannopoulos, 1993).

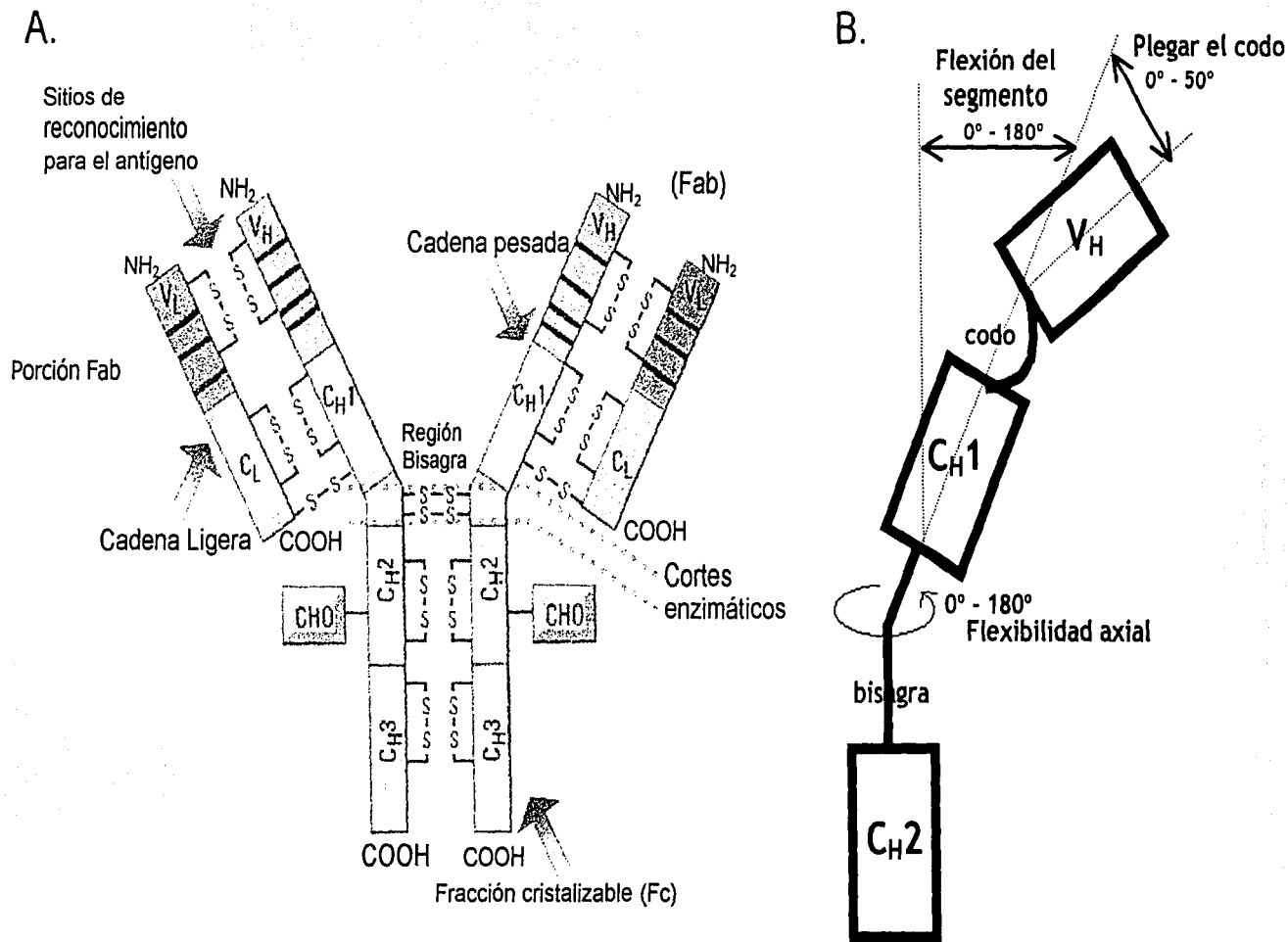
Al digerir a las inmunoglobulinas con papaína se pueden generar dos fragmentos, la porción que une al antígeno (Fab) y un fragmento constante (fracción cristalizable, Fc) que es la parte de la molécula que se une a los receptores (Fig. 3A). La región de la bisagra une a los Fab con el Fc, en esta zona las dos cadenas pesadas están unidas entre si a través de un número variable de puentes disulfuro. Los dominios variables N-terminales de ambas cadenas forman los sitios de unión al antígeno (Paul, 1993); mientras que, la porción Fc es reconocida por receptores de membrana (ver sección de receptores Fc).

La región de la bisagra determina muchas de las propiedades estructurales y funcionales de las inmunoglobulinas. Estructuralmente, la bisagra está formada por residuos de prolinas, serinas y treoninas, lo que le confiere flexibilidad a esa zona y permite que los brazos Fab se flexionen y tuerzan (Fig. 3B). El grado de movimiento se correlaciona con el largo de la bisagra entre el dominio  $C_H2$  y el primer puente disulfuro intercadena de la zona superior de la bisagra (Carayannopoulos, 1993). La longitud de la bisagra y su flexibilidad también reducen el impedimento estérico que los Fab presentan para el acceso al  $C_H2$  por otras moléculas. La flexibilidad de la bisagra permite a los Fab adoptar diferentes conformaciones y así poder unirse a epitopes bivalentemente -se presume que esto le da al anticuerpo mayor avidéz y versatilidad.

La bisagra puede ser dividida en tres regiones, la superior, el centro y la inferior: la bisagra superior se define como los residuos de aminoácidos entre el extremo del

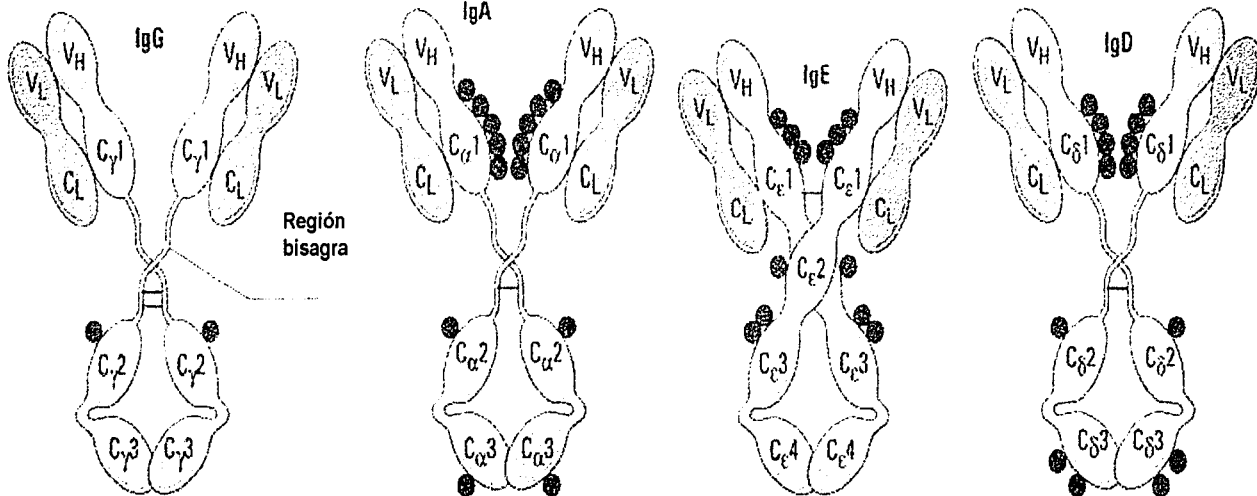
C<sub>H1</sub> y la primera cisteína que forma un puente disulfuro intracadena, una bisagra superior larga permitirá gran flexibilidad entre los segmentos y el ángulo entre los brazos Fab puede variar ampliamente; mientras que, una bisagra superior corta impide la movilidad de los brazos Fab. El centro de la bisagra contienen cisteínas que forman los puentes disulfuro intracadena. La región inferior de la bisagra está involucrada con el reconocimiento entre la Inmunoglobulina y el FcγR. Las regiones de la bisagra superior y media son codificadas por un mismo exón, esto se conoce como bisagra genética, mientras que la bisagra inferior es codificada por el exón del dominio C<sub>H2</sub>, en conjunto forman lo que se conoce como bisagra estructural (Carayannopoulos, 1993).

Existen distintas clases de inmunoglobulinas (Fig. 3C) y dentro de algunas clases hay distintas subclases (Fig. 3D). La clase más importante y abundante es la clase G, pues representa el 75% del total de inmunoglobulinas en suero. Las inmunoglobulinas de clase G presentan dos cadenas pesadas de pesos moleculares aparentes de 50 kilodaltones (kDa) y dos cadenas ligeras de 25 kDa (Carayannopoulos, 1993). En el humano se han distinguido cuatro subclases: IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4 (Fig. 3D1); mientras que en el ratón se identificaron a las subclases IgG1, IgG2a y 2b, e IgG3 (Fig. 3D2), siendo la IgG1 y la IgG2a las más abundantes. Estas subclases difieren entre sí en la estructura de la región constante de la cadena pesada, incluyendo diferencias en longitud y número de puentes disulfuro en la región de la bisagra; de esta manera, las cadenas pesadas de la IgG3 murina están unidas por dos puentes disulfuro intercadena y las otras subclases murinas por tres puentes.

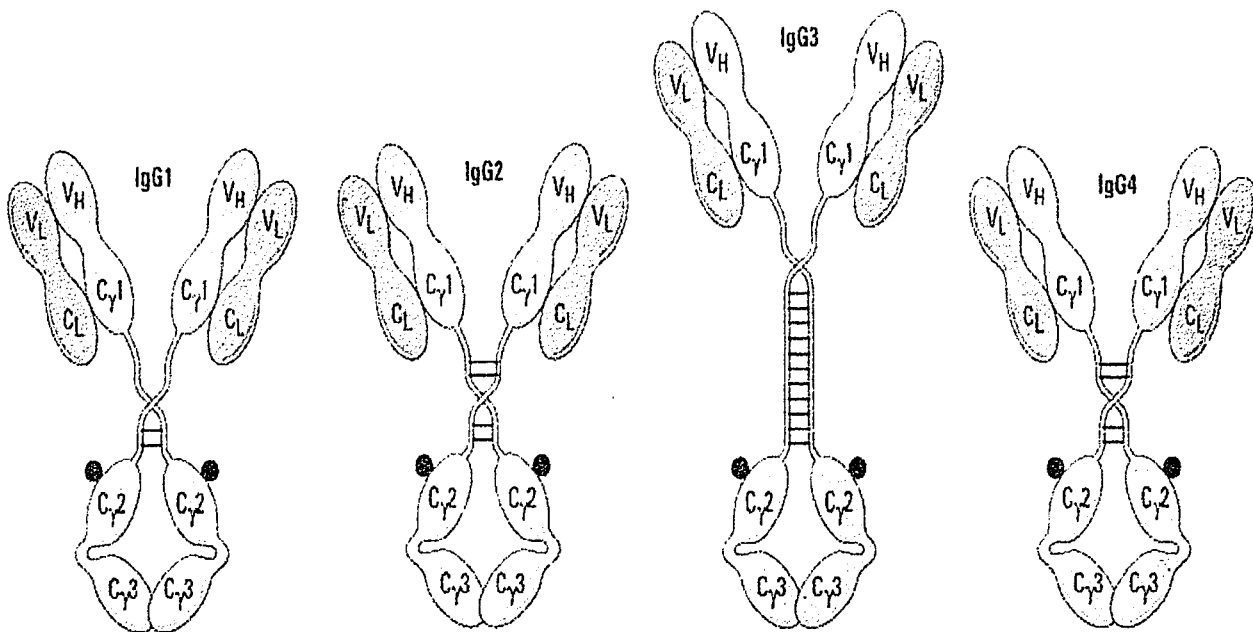


**Fig. 3. Las inmunoglobulinas.** A. Las inmunoglobulinas están formadas por dos cadenas pesadas y dos ligeras unidas entre sí por puentes disulfuro. Las inmunoglobulinas interactúan a través de su porción Fab con el antígeno y a través de su porción Fc con receptores de membrana presentes en las células del sistema inmunológico (Klein, 1997). B. Flexibilidad que exhiben los segmentos de las inmunoglobulinas con respecto a la bisagra (Paul, 1999). C. Las clases de inmunoglobulinas se diferencian por el número y localización de puentes disulfuro, por el número y localización de glicosilaciones o por el número de dominios de inmunoglobulina de tipo constante en la cadena pesada. D. Las principales diferencias entre las distintas subclases de IgG se presentan en la zona de la bisagra y dependen del número de puentes disulfuro. D1. Estructura esquematizada de las distintas subclases de IgG humanas (Klein, 1997). D2. Estructura tridimensional de los anticuerpos monoclonales 61.1.3 y 231 que corresponden a una IgG1 y a una IgG2a de ratón a 3.2 y 2.8 Å de resolución respectivamente (Harris, 1999).

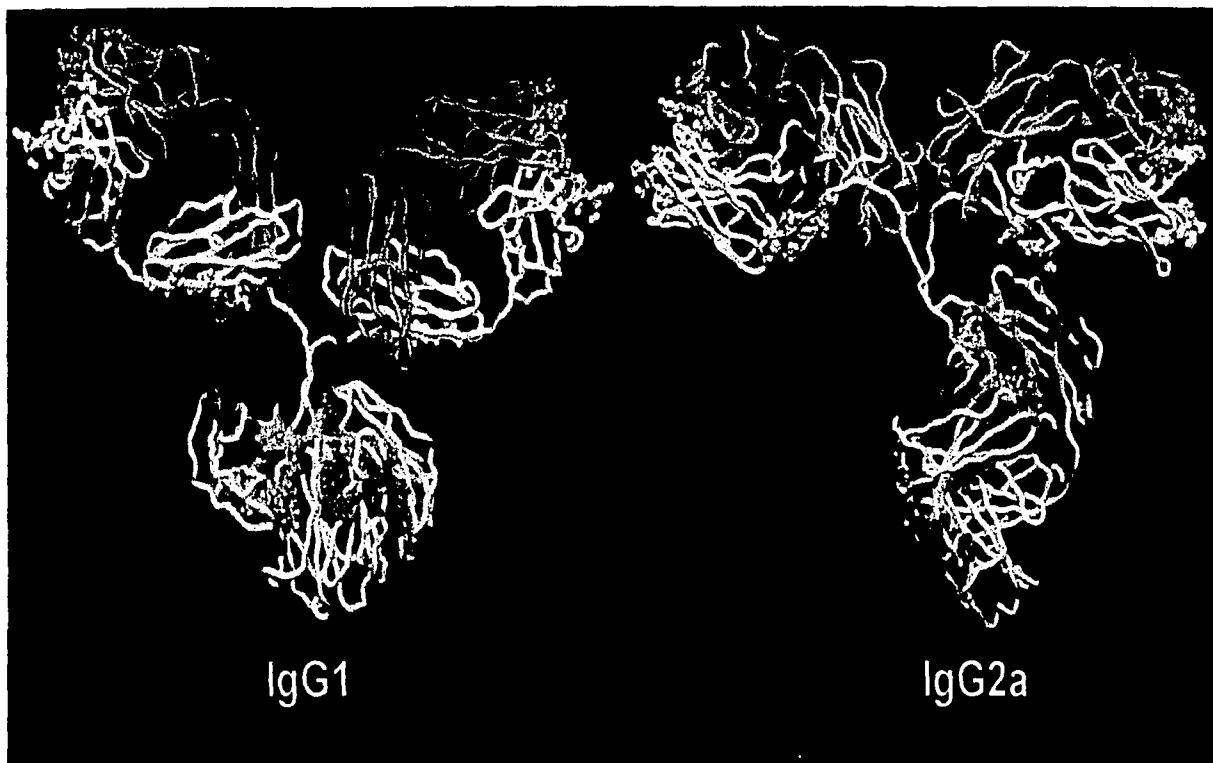
C.



D1.

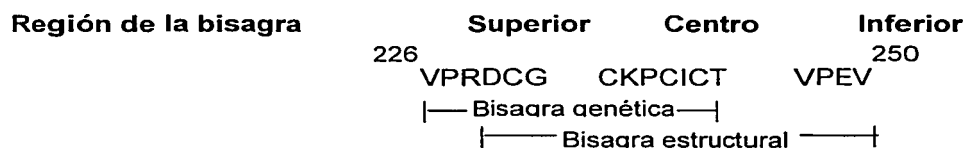


D2.



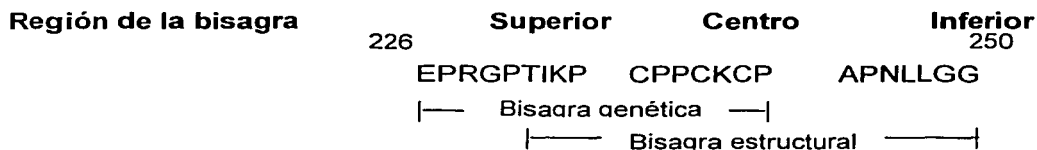


Gracias al desarrollo de la técnica para producir anticuerpos monoclonales pertenecientes a cada subclase se pudo determinar su secuencia y estructura. Así, en estudios de depolarización de fluorescencia, se determinó que la subclase IgG1 es la más rígida de todas las subclases murinas (Dangl, 1988); y en estudios de difracción de rayos X en cristales del anticuerpo 61.1.3, que corresponde a una IgG1 murina, se determinó que exhibe cierto grado de flexibilidad entre los segmentos y que presenta la típica forma en Y de las inmunoglobulinas. También se determinó que el ángulo entre los Fab es de  $115^\circ$  y que el Fc está orientado oblicuamente a  $107^\circ$  con respecto al plano de los Fab y que el ángulo de la región bisagra entre el Fc y el Fab es de  $78^\circ$  y entre el Fc y el Fab es de  $123^\circ$ . Además, los sitios de unión al antígeno están separados por 118 Å. Las inmunoglobulinas de esta subclase presentan la región bisagra más corta; la secuencia de la bisagra en el anticuerpo 61.1.3 es:



Durante el análisis de este anticuerpo se determinó que los aminoácidos contiguos a la zona de la bisagra superior son un punto crítico de flexibilidad y que este segmento de la inmunoglobulina se inmoviliza en solución por la disposición específica de los Fab. El centro de la región bisagra también es estabilizado por contactos intramoleculares entre residuos de esta zona con una asa del dominio  $C_{H2}$  (Harris, 1998).

Por otra parte, el anticuerpo 231 que es un IgG2a murina presenta la siguiente secuencia en la región bisagra:



Las cisteínas del centro de la bisagra de este anticuerpo son las que forman los puentes disulfuro intracadena; al igual que para inmunoglobulinas de la subclase IgG1; pero a diferencia de la corta región bisagra de las IgG1; las IgG2a presentan residuos de aminoácidos que aunque genéticamente forman parte del dominio C<sub>H</sub>2 estructuralmente forman parte de la región inferior de la bisagra. Este segmento es claramente la porción más móvil de la bisagra. La región de la bisagra completa tiene una extensión de 50 Å y por estudios de resonancia magnética nuclear se determinó que presenta distintas conformaciones, lo que sugiere que la región bisagra en la inmunoglobulinas de esta subclase no se comporta como tal, sino como una "cadena" que une al Fc con los Fab; es decir, el grado de movimiento entre los Fab y el Fc es aún mayor. Al parecer, en solución este anticuerpo presenta distintos estados estructurales que varían entre la forma de T y la de Y como consecuencia de la movilidad intrínseca entre sus dominios. Los ángulos que presentan las inmunoglobulinas de esta subclase son muy diferentes a los de las IgG1. El ángulo de la región bisagra entre el Fc y el Fab es de 66° y entre el Fc y el Fab es de 113°. Estas diferencias indican que la conformación molecular entre las inmunoglobulinas de las dos subclases es muy distinta (Harris, 1997).

Al comparar la secuencia de las distintas subclases murinas y humanas se determinó que la subclase IgG1 murina comparte un ancestro con las cuatro subclases humanas; mientras que, la subclase IgG2b presenta un ancestro distinto. Lo anterior

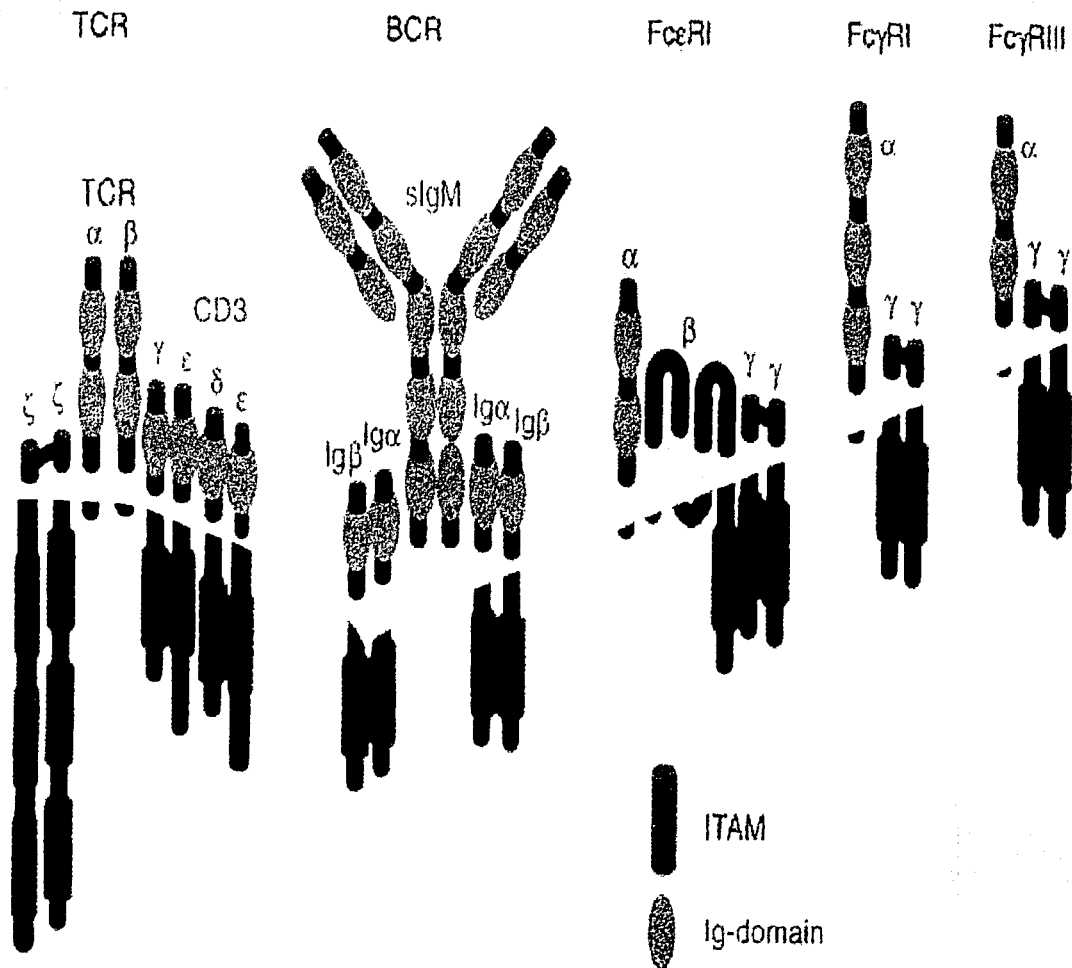
indica que los genes de las subclases IgG1 e IgG2 divergieron antes del proceso de especiación. En humano no hay una subclase equivalente a la IgG2 murina; al parecer, durante la evolución de estas secuencias a través de un proceso de contracción se perdió el gen (Adetugbo, 1978).

## **II.2b Los Receptores Multicadena de Reconocimiento Inmune**

Los Fc $\gamma$ R y Fc $\epsilon$ R se agrupan con los receptores de membrana involucrados en el reconocimiento del antígeno que incluyen a los receptores de antígeno de las células B (BCR, por sus siglas en inglés) y los receptores de antígeno de las células T (TCR, por sus siglas en inglés) (Fig. 4). Fueron agrupados así porque sus características estructurales y mecanismos bioquímicos de activación celular son similares. Este conjunto de receptores se denominó como Receptores Multicadena de Reconocimiento Inmune (MIRR, por sus siglas en inglés) (Keegan, 1992).

Los MIRR están constituidos por subunidades que unen al ligando y subunidades asociadas. Las cadenas involucradas en reconocer al ligando tienen en su porción extracelular dominios de inmunoglobulina (Keegan, 1992) (Fig. 4). Las subunidades asociadas tienen en su región citoplasmática estructuras supersecundarias involucradas en la activación de respuestas celulares, que están compuestas por dos secuencias consenso YxxL separadas por siete residuos variables (YxxLxxxxxxxYxxL). Esta secuencia es designada como ITAM (Fig. 4)(Reth, 1989).

En los Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIIIA las funciones de unión al ligando y activación celular son mediadas por cadenas diferentes. La cadena FcR $\alpha$  contiene el sitio de unión a IgG.



**Fig. 4. Receptores Multicadena de Reconocimiento Inmune.** Esquema que muestra la estructura de los receptores multicadena de reconocimiento inmune (MIRR). Aquí son agrupados el Receptor de antígeno de linfocitos T (TCR), el Receptor de antígeno de linfocitos B (BCR), el Receptor de alta afinidad para la porción Fc de la IgE (FcεRI) y los Receptores para la porción Fc de las IgG (FcγR) (Turner, 2000).

Esta cadena se expresa en asociación con un homodímero de cadenas gamma, las cuales contienen en su porción intracelular un ITAM. El Fc $\gamma$ RIIA y el Fc $\gamma$ RIIC son receptores para IgG de una sola cadena y poseen un solo ITAM (la misma cadena reconoce al ligando e induce la activación celular), en estos receptores las dos secuencias consenso están separadas por 12 residuos de aminoácidos (Reth, 1989).

La importancia de las regiones ITAM en los mecanismos de activación celular ha quedado demostrada por varias observaciones:

- a) La capacidad de los receptores para inducir funciones efectoras se anula completamente si los ITAM son eliminados de la proteína (Park, 1993).
- b) La capacidad de los receptores para inducir funciones efectoras se anula al cambiar (por mutación dirigida) las tirosinas de los ITAM por fenilalanina (Mitchell, 1994)
- c) Las respuestas bioquímicas inducidas por receptores quiméricos son idénticas a las inducidas por los receptores intactos. Estos receptores quiméricos están formados por los dominios extracelulares de diversos receptores, y los dominios transmembranal y citoplasmático de las cadenas gama o zeta que contienen intactos los residuos que forman al ITAM.

Los MIRR no tienen actividad intrínseca de cinasa. Cuando estos receptores son agregados inducen la activación de cinasas de tirosina intracelulares. Esta relación se estableció cuando se utilizaron inhibidores de cinasas de tirosina, y se observó que las cadenas que contienen a los ITAM no eran fosforiladas y no eran inducidas las vías bioquímicas de activación celular (Einspahr, 1991).

## **II.2c Características moleculares de los receptores para inmunoglobulinas.**

Los receptores para inmunoglobulinas mejor caracterizados son los receptores para IgE (FcεRI) y para IgG (FcγR). Los FcγR están formados por las subunidades FcRα y FcRγ, exceptuando al FcγRIIA, B y C. La subunidad FcRα es una molécula transmembranal que tiene dos o tres dominios extracelulares de Inmunoglobulina de tipo variable (tipo-V) y es la encargada de unir al ligando (revisado en Raghavan, 1997). La cadena FcRγ es una molécula transmembranal con una porción citoplasmática donde se localiza el ITAM y que se expresa como homodímero. La cadena FcRα y el dímero de cadenas FcRγ se asocian a través de interacciones no covalentes. En el mastocito, el complejo αγ<sub>2</sub> del receptor FcεRI se asocia además con una subunidad FcRβ.

Los FcR reconocen con alta o baja afinidad a su ligando. Los FcR de alta afinidad pueden unir inmunoglobulinas monoméricas, como los receptores para IgE, IgG e IgA. Estos receptores tienen una constante de afinidad del orden de 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> M<sup>-1</sup> para el FcεRI en mastocito, de 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> para los receptores FcγRI en macrófago y de 5 x 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> para el FcαR en monocito. Los FcR de baja afinidad no unen inmunoglobulinas monoméricamente con una afinidad mensurable (revisado en Daëron, 1997).

## **II.2d Receptores para inmunoglobulinas clase G**

Distintos tipos celulares expresan a los FcγR, como son linfocitos T activados, linfocitos B, monocitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, células cebadas

y células asesinas naturales (revisado en Daëron, 1997).

Los receptores para IgG son un grupo heterogéneo de moléculas. Basándose en su secuencia de aminoácidos y en su afinidad por el ligando, se han clasificado en tres tipos: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII y dentro de cada tipo existen diversas isoformas (Sanchez-Mejorada, 1998) (Fig. 5).

Los receptores para IgG tienen dominios extracelulares que unen al ligando y están relacionados estructuralmente. Cada miembro de esta familia es una glicoproteína integral de membrana, con excepción del Fc $\gamma$ RIIIB expresado en neutrófilos, el cual está anclado a la membrana por un enlace a glucosilfosfatidilinositol (GPI) (Sanchez-Mejorada, 1998) (Fig. 5).

Varios datos indican que el contacto entre los Fc $\gamma$ R y las IgG, tanto en el sistema murino como humano, involucra la región de la bisagra inferior y una asa del dominio C<sub>H</sub>2 (Lund, 1992). Este contacto induce cambios conformacionales en la región de la bisagra inferior en ambas cadenas pesadas de la inmunoglobulina y es muy posible que la flexibilidad de la región bisagra los facilite (Kato, 2000).

Fc $\gamma$ RI (CD64). Receptor de alta afinidad para IgG.

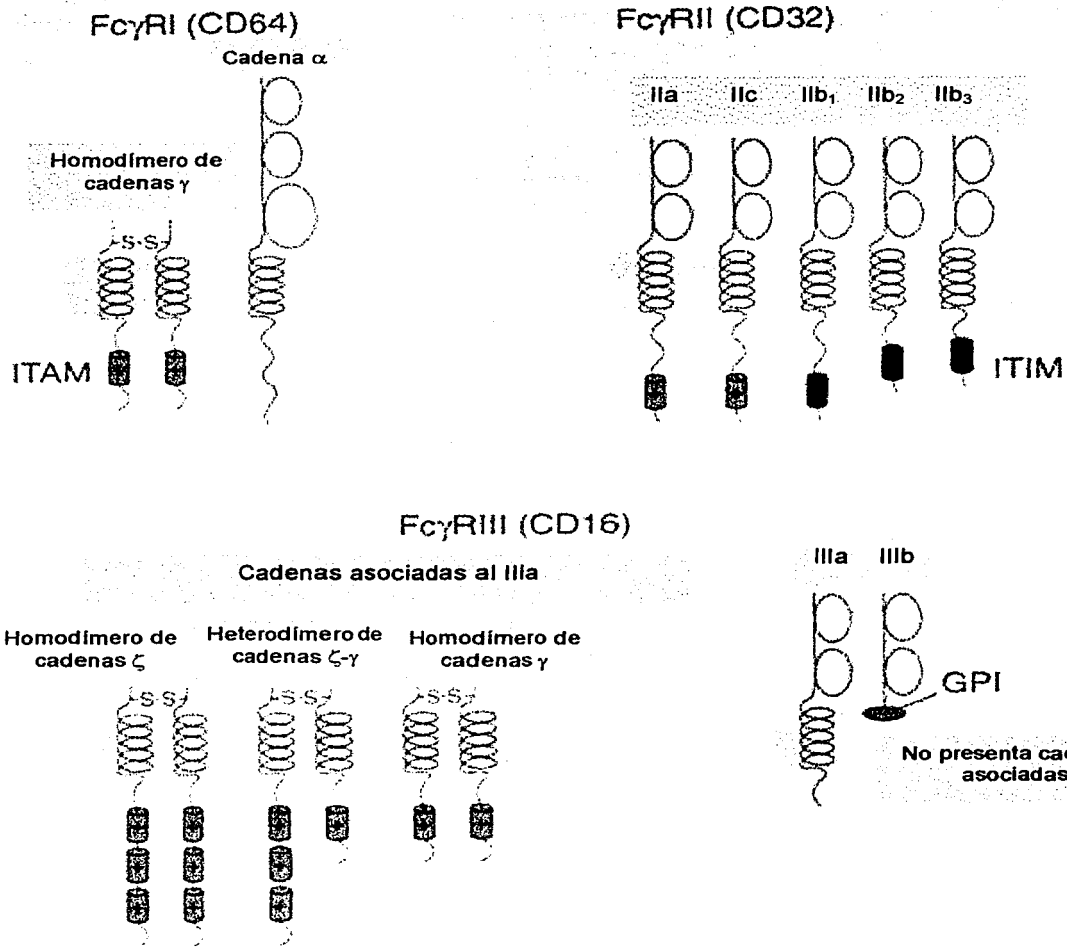
El receptor Fc $\gamma$ RI (CD64) es el único tipo de receptor para IgG que une IgG monomérica. Es codificado por un solo gen, ubicado en el cromosoma 1 (q21-23), y se han identificado tres distintos transcritos. Se expresa en monocitos y macrófagos y su expresión se induce en neutrófilos por tratamientos con INF- $\gamma$  (Fig. 5). (revisado en Daëron, 1997).

El Fc $\gamma$ RI expresado en células humanas tiene seis sitios de glicosilación; mientras que el Fc $\gamma$ RI expresado en células de ratón tiene cinco, los pesos moleculares aparentes de estos receptores son de 72 y 67 kDa respectivamente. Contiene en su región extracelular tres dominios de inmunoglobulina, de los cuales los dos primeros son homólogos a los del Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. El tercer dominio podría estar involucrado en la alta afinidad del receptor. El Fc $\gamma$ RI se encuentra asociado a dímeros de cadena  $\gamma$  que contienen secuencias ITAM (revisado en Daëron, 1997).

Fc $\gamma$ RII (CD32). Receptor de baja afinidad para IgG.

A diferencia de otros receptores Fc $\gamma$ , los receptores de este grupo constan de una sola cadena, que contiene en su región extracelular el sitio de unión de IgG, y en la parte citoplasmática secuencias involucradas en la activación (Fig. 5). Los receptores Fc $\gamma$ RII son sialoglicoproteínas de 40 kDa, con dos dominios extracelulares tipo inmunoglobulina. En el ratón, hay dos genes (A y B) que codifican para los receptores de este grupo. El gen A produce un RNAm que codifica para una proteína de peso molecular aproximado de 47 kDa (revisado en Daëron, 1997). El gen B produce dos RNAm distintos, denominados b1 y b2. Estos son generados por el procesamiento alternativo de los exones que codifican la región citoplasmática del receptor. La forma b1 se expresa en células del linaje linfóide y la b2 en células del linaje mielóide. Ambas formas contienen cuatro sitios de glicosilación y su peso molecular aproximado es de 40-60 kDa respectivamente (revisado en Daëron, 1997).





**Fig. 5. Receptores para inmunoglobulinas.** Esquema de la estructura y organización entre las subunidades de los Fc $\gamma$ R. En los Fc $\gamma$ R, la porción extracelular de la cadena que reconoce al ligando, presenta dominios de inmunoglobulina; mientras que, la porción citoplasmática de esta o bien de cadenas asociadas presentan secuencias consenso involucradas en transducir la señal iniciada por la unión del ligando. Estas secuencias consenso han sido nombradas ITAM, por participar en la activación de diversas respuestas celulares; e ITIM, por estar involucradas con la inhibición de respuestas celulares (Modificado de Deo, 1997).

El Fc $\gamma$ RII (CD32) en humanos está codificado por tres genes localizados en el cromosoma 1 designados A, B y C. Se han identificado distintas isoformas derivadas de los tres genes (Fig. 5). Contiene dos o tres sitios de glucosilación y su peso molecular aparente es de 40 kDa. Los Fc $\gamma$ RIIa y Fc $\gamma$ RIIc se expresan preferentemente en macrófagos, monocitos y neutrófilos, mientras que el Fc $\gamma$ RIIb se encuentra en linfocitos T y B, neutrófilos, monocitos y macrófagos (revisado en Sanchez-Mejorada, 1998).

El tallo citoplasmático de la cadena única de los Fc $\gamma$ RIIa y c contiene el ITAM (Fig. 5). Los Fc $\gamma$ RIIb no contienen la secuencia ITAM, ellos contienen una secuencia que se ha denominado dominio de inhibición basado en tirosina (ITIM, por sus siglas en inglés). Esta secuencia esta involucrada en la regulación negativa del receptor de antígeno de linfocitos B (revisado en Santana, 1996; Sánchez-Mejorada, 1998).

Fc $\gamma$ RIII (CD16). Receptor de baja afinidad para IgG.

El receptor murino Fc $\gamma$ RIII esta codificado por un solo gen, ubicado en el cromosoma 1, el cual origina un solo transcrito. El Fc $\gamma$ RIII esta asociado a homodímeros o heterodímeros de las cadenas  $\gamma$  ó  $\zeta$ , que le permiten expresarse en la membrana (revisado en Daëron, 1997).

Las formas expresadas en humano son dos: Fc $\gamma$ RIIIa y Fc $\gamma$ RIIIb, productos de dos genes distintos A y B, designados CD16 (Fig. 5). El primero codifica para una proteína transmembranal que está asociada a homodímeros o heterodímeros de las cadenas  $\gamma$  ó  $\zeta$ , mientras que el segundo codifica para una proteína que se ancla a la membrana plasmática por un glucosilfosfatidilinositol (GPI). No se han encontrado

cadenas asociadas al Fc $\gamma$ RIIIb, aunque si se ha observado que coopera en la señalización a través de otros receptores (Rosales 1993). El Fc $\gamma$ RIIIa es expresado en macrófagos, monocitos activados, células NK, células preB y células T. El Fc $\gamma$ RIIIb se expresa exclusivamente en neutrófilos (revisado en Daëron, 1997).

### **II.3 SEÑALES BIOQUÍMICAS INICIADAS POR LA AGREGACION DE LOS FcR**

Las inmunoglobulinas a través de sus porciones Fab reconocen antígenos en la superficie de organismos invasores, formando agregados de inmunoglobulinas en la superficie del organismo invasor. Con esto se marca al organismo que va a eliminarse (opsonización). Los FcR expresados en una célula que encuentra una partícula opsonizada con inmunoglobulinas, reconocen la porción Fc y son agregados en la zona de reconocimiento. La sola agregación es capaz de inducir señales bioquímicas que conducen a distintas respuestas celulares (revisado en Daëron, 1997).

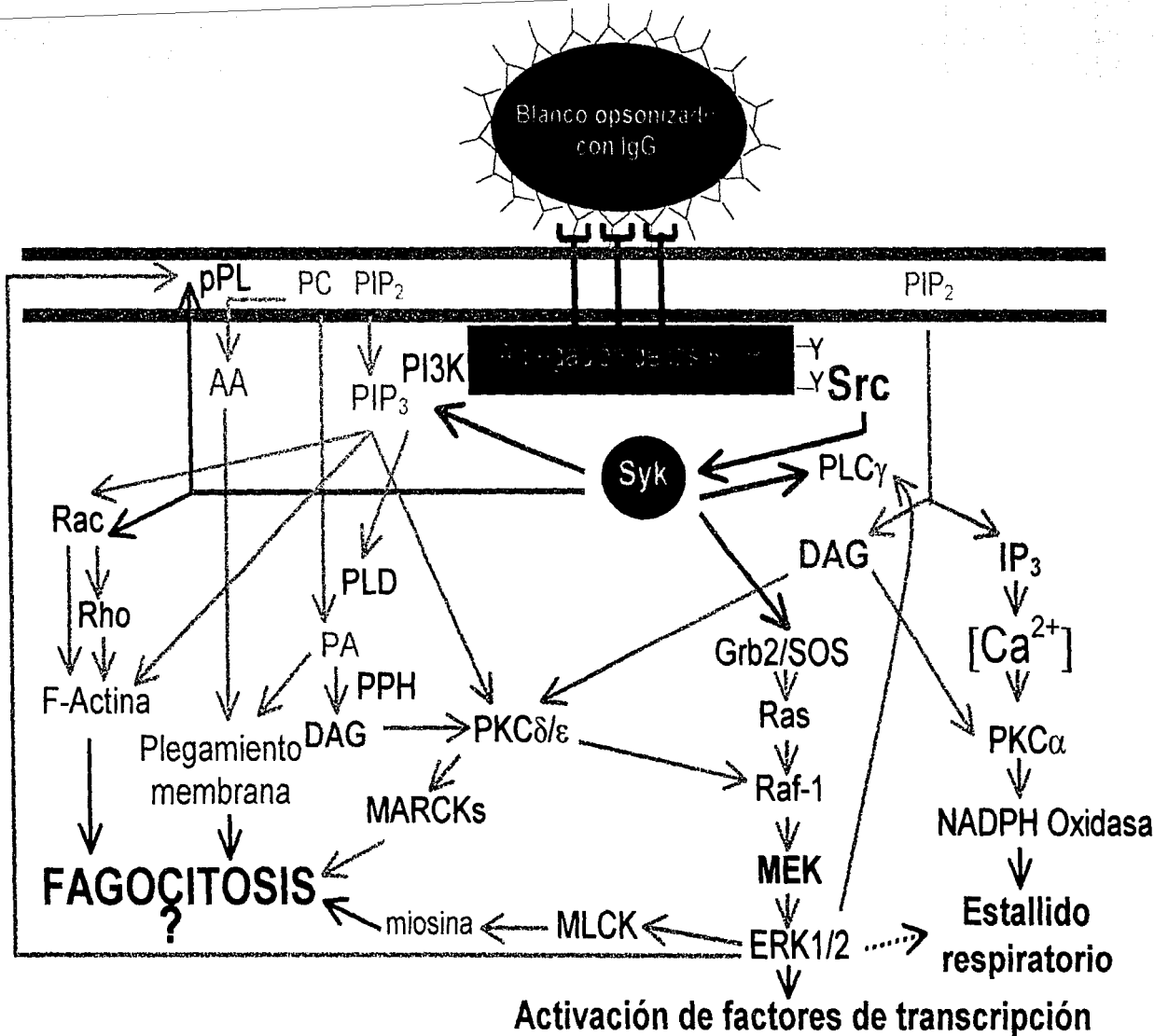
La reacción bioquímica más temprana y común tras la agregación de los FcR es la fosforilación de las tirosinas presentes en las secuencias ITAM, como sucede en los ITAM de las cadenas  $\gamma$  y  $\beta$  del Fc $\epsilon$ RI dentro de los primeros 15 segundos después de la agregación (Fig. 6) (revisado en Daëron, 1997).

La fosforilación de los ITAM se relaciona con la activación de cinasas de tirosina (PTK), pertenecientes a distintas familias. Las primeras cinasas que son activadas pertenecen a la familia Src, cuyo aumento en actividad ha sido demostrado tras la agregación de los receptores para IgG (Hamada, 1993; Piganata, 1993; Germano, 1994; Ghazizadeh, 1994; Durden, 1995). Las tirosinas del ITAM tras ser fosforiladas por

cinastas de la familia Src, sirven como sitio de anclaje para las cinastas de la familia Syk/ZAP-70. Esta asociación se propone a partir de la coprecipitación de Syk con las cadenas del FcR en varios sistemas (Fukamachi, 1993; Durden, 1994; Ghazizadeh, 1995; Zeitlmann, 1998) y se da a través de los dominios de homología dos con Src (SH2, por sus siglas en inglés) de la molécula de Syk, que son capaces de asociarse a tirosinas fosforiladas. Al parecer, esta asociación es suficiente para activar a la cinasa (Strzelecka, 1997; Strzelecka, 1997a).

Con la agregación de los FcR son activadas otras cinastas de tirosina. La cinasa de Bruton (Btk) y Emt, cinastas de tirosina de la familia Tec (Kawakami, 1994; Louvin, 1994); así como Fer (Kawakami, 1995), la cinasa de adhesión focal (FAK) (Penhallow, 1995) y la cinasa activada por mitógenos (MAPK) (Hamawy, 1995) son activadas en células RBL con la agregación del FcεRI.

Se han identificado una serie de eventos bioquímicos intracelulares que siguen a la activación de las cinastas Src y Syk, que sólo se conocen parcialmente. Se observa la activación de la proteína cinasa C (PKC), la proteína cinasa A (PKA) y la vía de señalización de la cinasa activada por mitógenos, ERK. También participan la cinasa de 3-fosfatidilinositol (PI 3-K) y la Fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), la Fosfolipasa Cγ1 (PLCγ1) y la Fosfolipasa D (PLD) (Revisado en Daéron, 1997) (Fig. 6). Las relaciones causales, temporales y de modulación recíproca entre estas enzimas, así como su relación con las vías específicas de señalización de los distintos FcR, varían dependiendo del receptor que es activado, del tipo de célula que es estimulada, así como del estado de maduración y activación celular (Colucci, 1999).



**Fig. 6. Señales bioquímicas iniciadas por el entrecruzamiento de los FcγR.** El entrecruzamiento de los FcγR induce la activación de cinasas de la familia Src y de la familia Syk. Cinasas de la familia Src fosforilan y se asocian a las tirosinas (Y) de las secuencias consenso ITAM y activan a Syk. A su vez Syk activa a distintas enzimas involucradas en distintas funciones celulares. FcγR, Receptores para IgG; PI3K, Fosfatidilinositol 3-cinasa; Fosfolipasa Cγ, PLCγ; Fosfolipasa D, PLD; Fosfolipasa fagocítica, pPL; Fosfatidato fosfohidrolasa, PPH; Proteína Cinasa C, PKC; Cinasa activada por mitógenos, MEK; Cinasa regulada por señales extracelulares, ERK; Cinasa de la cadena ligera de la miosina, MLCK; Sustrato de PKC miristoilado y rico en alanina, MARCK; Diacilglicerol, DAG; ácido fosfatídico, PA; fosfatidilcolina, PC; ácido araquidónico, AA; concentración de iones calcio, [Ca<sup>2+</sup>]; fosfatidilinositol trifosfato, PIP<sub>3</sub>; fosfatidilinositol bifosfato, PIP<sub>2</sub>; inositol trifosfato, IP<sub>3</sub>.

## **II. 3a Señalización intracelular inducida por la agregación de los FcR que conduce a la fagocitosis**

Los Fc $\gamma$ R median funciones efectoras como la endocitosis de complejos inmunes, fagocitosis, citotoxicidad mediada por anticuerpos y la liberación de moléculas con actividad proinflamatoria, inmunomoduladora, o citotóxica y antimicrobiana (Brack, 1998). Estos receptores generan señales que estimulan funciones celulares como mitogénesis, diferenciación, expresión génica y síntesis de proteínas (Santana y col., 1996).

Dentro de estas funciones una de las más importantes es la fagocitosis, pues está involucrada en la destrucción de microorganismos y la eliminación de complejos inmunes y restos celulares sin que sean dañadas células aledañas (Greenberg, 1993).

Entre los receptores capaces de mediar fagocitosis que han sido identificados en los macrófagos se encuentran los receptores para la porción Fc de la molécula de inmunoglobulina clase G, el Fc $\gamma$ RIIa y el Fc $\gamma$ RIIIb (Berken, 1966; Brown 1995), los receptores tipo 3 para productos del tercer componente del complemento (CR3) (Lay, 1968), los receptores para manosa y polisacárido y los receptores "scavenger" que reconocen moléculas en la superficie de células apoptóticas (Aderem, 1999). De estos, los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas clase G son los más estudiados por su importancia dentro de los procesos de inflamación (Brown, 1995).

Aunque la fagocitosis como proceso celular involucrado en la defensa contra patógenos se describió desde principios del siglo XIX (Rabinovitch, 1995), aún hoy no se conocen los mecanismos que la dirigen. La complejidad de la fagocitosis se debe, en

parte, a la diversidad de receptores capaces de estimular la fagocitosis, a las interacciones entre ellos y entre las vías de señalización que activan (Indik, 1995; Aderem, 1999). Se sabe de muchos componentes del citoesqueleto que participan en la adhesión que también participan durante la extensión de la membrana en la fagocitosis, estos incluyen proteínas como paxilina, talina (Greenberg, 1990), vinculina,  $\alpha$ -actinina, proteína cinasa  $C\alpha$ , MARCKS y MacMARCKS (Allen, 1995; Allen, 1996).

La fagocitosis involucra distintas estructuras en la internalización de la partícula. Durante la fagocitosis se requiere de la polimerización de actina en el sitio de ingestión. En células tratadas con citocalasina B (compuesto que inhibe la polimerización de la actina), no se observó fagocitosis (Zigmond, 1972) y en macrófagos donde se utilizó faloidina-rodamina para visualizar la actina polimerizada, se observó que polimerizaba en los pseudópodos después de dos minutos de estar en contacto con eritrocitos opsonizados con IgG (revisado en Greenberg, 1995). Los mecanismos por los cuales los  $Fc\gamma R$  estimulan la polimerización de actina e inducen la formación del fagosoma no se conocen; sin embargo, al parecer participan proteínas como la Fosfatidilinositol 3-Cinasa (PI-3 K), GTPasas de la familia de Rho, la Proteína Cinasa C (PKC) y proteínas motor como la miosina I, (revisado en Greenberg, 1995; Kwiatkowska, 1999).

### **II.3b La Fosfolipasa D en la fagocitosis mediada por los $Fc\gamma R$**

La Fosfolipasa D (PLD) está ampliamente distribuida en organismos eucariontes; cataliza una reacción de transesterificación, en su caso una transfosfatilación usando una cadena corta de alcohol primario como grupo aceptor del fosfatidil (Ella, 1997).

La PLD hidroliza a fosfatidilcolina (PC), para generar ácido fosfatídico (PA) y colina. El PA es rápidamente desfosforilado por la enzima Fosfatidato Fosfohidrolasa (PPH) para formar el 1,2-*sn*-diacilglicerol (DAG). A partir del PA también puede formarse ácido *liso*-fosfatídico por la actividad de la Fosfolipasa A<sub>2</sub> específica de PA (English, 1996).

Todos los genes eucariontes que codifican para la PLD, generan una proteína que presenta un sitio catalítico conservado, flanqueado por regiones menos conservadas hacia las porciones amino y carboxilo terminal. El sitio catalítico comprende los dominios I-IV. Entre estos dominios hay una gran similitud (Ponting, 1996).

La PLD presenta, hacia la región amino terminal, un dominio PX (Ponting, 1996a) que no se requiere para la actividad catalítica (Sung, 1999); este dominio parece participar en interacciones intermoleculares. Estudios en la PLD-1 humana indican que el dominio PX es necesario para que la PLD interaccione con otras proteínas (Sung, 1999). El dominio IV contiene la secuencia HXKX<sub>4</sub>DX<sub>5</sub>IGSXN, llamada estructura supersecundaria HKD o estructura de fosfatidiltrasferasa (Waksman 1996). Por estudios de mutagénesis se ha demostrado que juega un papel importante en la catálisis (Sung, 1997).

Las isoformas de PLD en mamíferos incluyen a la PLD-1a, PLD-1b (una variante generada por el procesamiento alternativo de los exones, que carece de un segmento de 38 aminoácidos) y la PLD-2 (Hammond, 1995; Hammond, 1997; Kodaki, 1997). Las dos variantes de la PLD-1 son inhibidas por oleato y reguladas sinérgicamente por ARF-1, Rho A, Rac-1, Cdc42, y PKC $\alpha$ , en presencia de PIP<sub>2</sub>. La PLD-1a es una



proteína de 1074 residuos de aminoácidos con un peso estimado de 120 kDa, y la PLD-1b consta de 1034 residuos (Hammond, 1995; Hammond, 1997). La PLD-2, por otro lado, es activa constitutivamente en presencia de  $PIP_2$  y su actividad no es regulada por otras proteínas, aunque es inhibida por oleato. La PLD-2 es una proteína de 932 residuos y tiene un peso estimado de 96 kDa (Colley, 1997). La PLD-1 y la PLD-2 son homólogas y presentan una similitud de 51%. La región que es esencial para la actividad catalítica está muy conservada (revisado en Cissel, 1999).

Modificaciones postranscripcionales parecen determinar la ubicación de estas enzimas en la célula. La PLD-1b de rata es una glucoproteína en la cual las N-glicosilaciones la ubican en compartimientos membranales (Min, 1998). La PLD-1a humana esta palmitoilada y esta modificación lipídica, al parecer, es esencial para la actividad de la enzima (Manifava, 1999). La PLD-1 se asocia con las membranas perinucleares, como Golgi y el Retículo Endoplásmico, así como con endosomas tardíos, mientras que la PLD-2 se asocia principalmente con la membrana plasmática (Colley, 1997).

La activación de la PLD se asocia a la desgranulación estimulada por agregados de IgG en neutrófilos (Gewirtz, 1997). En células U937 diferenciadas con  $INF\gamma$  el entrecruzamiento de los  $Fc\gamma R$  estimula a la PLD, su activación se asocia a la elevación de los niveles de calcio intracelular y al tráfico vesicular de los complejos inmunes internalizados para la degradación lisosomal. La activación de la PLD se asocia a la fagocitosis de partículas opsonizadas por complemento en macrófagos (Kusner, 1996) y neutrófilos (Fallman, 1992).

La PLD también es activada durante la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R. En macrófagos humanos el entrecruzamiento de los Fc $\gamma$ R induce la activación de la PLD y se requiere de su actividad durante la fagocitosis de la partícula (Kusner, 1999).

### **II.3c La fosfatidilinositol 3-cinasa y su papel en la señalización inducida por el entrecruzamiento de los Fc $\gamma$ R**

La fosfatidilinositol 3-cinasa (PI 3-K) está involucrada en la señalización a través de los Fc $\gamma$ R. Esta enzima genera fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>), al fosforilar en la posición D3 al anillo de fosfatidilinositol (PtdIns) y a otras especies fosforiladas de PtdIns, como el PtdIns(4)P y del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, que tienen un papel importante en la señalización (revisado en Toker, 1997). La PI 3-K pertenece a una familia de enzimas homólogas en su dominio catalítico, el cual es denominado región de homología 1 (HR1) (Kapeller, 1994).

Las PI 3-K se agrupan en tres clases, basándose en su selectividad por sustratos específicos en ensayos *in vitro*. Las PI 3-K de clase I son heterodímeros de aproximadamente 200 kDa, compuestos por una subunidad catalítica de aproximadamente 110-120 kDa y una subunidad adaptadora de entre 50-100 kDa. Las enzimas pertenecientes a esta clase son capaces de fosforilar *in vitro* PtdIns, PtdIns(4)P, y PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Klarlund, 1997). Sin embargo, en ensayos *in vivo* el sustrato para las PI 3-K de clase I es el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (revisado en Hunter, 1995).

Las PI 3-K de clase II son proteínas de entre 170 –210 kDa con un dominio C2 hacia la porción carboxilo terminal que une Ca<sup>2+</sup> (Panaretou, 1997). No se han

identificado moléculas adaptadoras y no se conoce la forma de activación de estas enzimas. Las enzimas pertenecientes a esta clase fosforilan *in vitro* PtdIns y PtdIns(4)P (revisado en Hunter, 1995).

Las PI 3-K de clase III son homólogas a la proteína Vps34p de *Saccharomyces cerevisiae*. La proteína Vps34p se asocia a la proteína Vps15 que es una cinasa de serina/treonina (Schu, 1993). Vps15 recluta a Vps34p a la membrana y la activa como cinasa de lípidos. En mamíferos se clonó una proteína con 30% de identidad con Vps15. Esta proteína, llamada p150, actúa como adaptadora para la PI 3-K clase III (Panaretou, 1997). El complejo PI 3-KIII-p150 exhibe actividad de cinasa de fosfoinosítidos y de cinasa de serina/treonina (Vanhaesebroeck, 1999). Fosforilan *in vitro* exclusivamente PtdIns en la posición 3 del anillo, por lo que se ha propuesto que reciba el nombre de cinasa específica para fosfatidilinositol-3 (PtdIns3K) (revisado en Vanhaesebroeck, 1999). La actividad de la PI 3-K clase III depende de que sea fosforilada en serina/treonina (revisado en Wymann, 1998).

Las PI 3-K de Clases I y III están involucradas en la fagocitosis. La actividad de PI 3-K clase III se requiere durante la maduración del fagosoma (Viera, 2001), mientras que la actividad de PI 3-K de Clase I se requiere durante la internalización de la partícula (Cox, 1999).

Después de la activación celular por agonistas, la PI 3-K de clase I es translocada a la membrana plasmática, ganando así acceso a su sustrato. En este proceso participan las subunidades adaptadoras que pueden asociarse a secuencias de tirosina fosforilados (clase IA), o bien interactuar con las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas G triméricas (clase IB) (revisado en Wymann, 1998).

Las PI 3-K de clase IA presentan una subunidad adaptadora de 50-85 kDa (p85 es el prototipo) asociada constitutivamente a la subunidad catalítica, p110. Hacia la región amino terminal de p85 se encuentra un dominio de homología Src 3 (SH3), seguido por un dominio BH (las siglas en inglés de breakpoint-cluster-region homology region), que interactúa específicamente con proteínas de la familia Rho y no presenta actividad de GTPasa. Este dominio está flanqueado por dos regiones ricas en prolina. Hacia la región carboxilo terminal de p85 se encuentran dos dominios de homología Src 2 (SH2). Entre los dominios SH2 se encuentra una región involucrada en la unión con la subunidad catalítica, denominada región inter-SH2 (iSH2) (revisado en Wymann, 1998).

La subunidad catalítica, p110, contiene un dominio de unión a p85, una región para la asociación con Ras (Rodriguez-Viciano, 1996), un dominio de cinasa de PtdIns [PIK, región conservada entre las PI 3-K (Flanagan, 1993)], y el dominio de cinasa de proteínas en serina y treonina que se ubica hacia la porción carboxilo terminal (Domin, 1997). La actividad de cinasa en serina y treonina de la PI 3-K de clase IA le permite fosforilar a la subunidad adaptadora en la región iSH2 y con ello regular la actividad de cinasa de lípido de la subunidad catalítica (Dhand, 1994).

En mamíferos existen tres isoformas de la subunidad catalítica, mientras que existen siete isoformas de la subunidad reguladora. Las subunidades p110 $\alpha$  y  $\beta$  están ampliamente distribuidas en todo el organismo, mientras que la subunidad p110 $\delta$  tiene una distribución más restringida encontrándose principalmente en leucocitos (revisado en Vanhaesebroeck, 1999).

Al menos una isoforma de PI 3-K de clase IA se expresa en todos los tipos celulares de mamíferos y están involucradas en la activación celular. La cantidad de PI

3-K activa aumenta cuando la estimulación de distintos receptores inicia cascadas de fosforilación en tirosina (Toker, 1997). Las PI 3-K de clase IA están involucradas en la fagocitosis. Las PI 3-K de clase IB son activadas por la estimulación de receptores para quimioatrayentes y se requiere de su actividad para activar a la NADPH oxidasa (Didichenko, 1996).

Durante la fagocitosis, la actividad de PI 3-K clase IA permite la extensión de los pseudópodos y la formación del fagosoma. En neutrófilos y macrófagos tratados con wortmanina (compuesto que inhibe a la PI 3-K) se inhibe la fagocitosis mediada por FcγR (Toker, 1997); en estos casos el macrófago es capaz de unir a la partícula opsonizada; sin embargo, no es capaz de internalizarla pues no ocurre la extensión de los pseudópodos y la formación del fagosoma (Araki, 1996; Toker, 1997; Lennartz, 1997; Cox, 1999). Su papel en la fagocitosis podría deberse a que su producto, el PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, reclute proteínas involucradas en controlar el citoesqueleto de actina. Algunas candidatas son las proteínas Vav y ARNO (Vanhaesebroeck, 2001) y la profilina y la gelsolina (Toker, 1997).

### **II.3d La cinasa regulada por señales extracelulares, ERK, y su papel en la señalización inducida por el entrecruzamiento de los FcR**

Las cinasas activadas por mitógenos o MAP cinasas (MAPK), son una familia multigénica de cinasas citosólicas de serina/treonina. La actividad de estas cinasas se ha asociado a la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis y otros procesos celulares (Marshall, 1995). Las MAPK son las enzimas terminales de una serie de

quinasas que se activan una a la otra de manera secuencial, a través de fosforilaciones, para propagar una cascada de activación celular. Estas cinasas sirven para amplificar y mantener la fidelidad de la cascada de activación, pues son selectivas en las interacciones con sus activadores y con sus sustratos.

Una característica que permite distinguir las como MAPK es la presencia de una estructura de fosforilación en serina/treonina: TXY, donde X puede ser una glutamina, prolina o glicina.

Las MAPK son activadas a través de fosforilaciones en treonina y tirosina ubicadas en la estructura de fosforilación, por un grupo específico de cinasas duales; las cinasas de MAP cinasa, también llamadas MEK (revisado en Zhang, 1999). La selectividad en las interacciones con sus activadores y con sus sustratos está dada por la secuencia de residuos de la estructura de fosforilación dual y es influenciada por el asa de unión (Jiang, 1997).

En células de mamífero se han descrito cuatro clases de MAPK, que incluyen: las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK-1 y ERK-2, también llamadas p42 y p44 MAPK); las cinasas para la porción amino terminal *c-Jun* (JNK), también llamadas cinasas activadas por estrés (SAPK); la MAP cinasa p38 y la MAP cinasa grande-1 (BMK-1).

Las cinasas ERK son activadas en respuesta a factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); o a factores que inducen la diferenciación celular, como el factor de crecimiento nervioso (NGF) (revisado en Zhang, 1999). En neutrófilos humanos al agregar al FcγRIIa y al FcγRIIIb, se estimula la actividad de ERK (Coxon, 2000).

La activación de la vía de ERK involucra la comunicación entre el receptor y la vía de Ras, a través de la formación de complejos multiméricos entre proteínas adaptadoras y factores de intercambio de nucleótidos de guanina. En la activación mediada por FcγR se ha observado el ensamblaje de la proteína adaptadora Grb2 y la proteína intercambiadora de GTP: SOS. Grb2/SOS conducen a la activación de proteínas G de bajo peso molecular como Ras, Rac y Rho (Revisado en Sanchez-Mejorada, 1998). Sin embargo, se ha propuesto la existencia de vías alternas para la activación de ERK, que no involucran a Ras (Sanchez-Mejorada, 1998a; Grammer, 1997).

En la vía clásica de activación de las MAPK, cuando Ras es activada se asocia a la porción amino terminal de la cinasa de serina/treonina Raf-1 que la coloca en proximidad de la membrana plasmática. Raf-1 es activada por fosforilación (aún no se ha determinado cuál es la cinasa responsable), y su actividad es modulada por PKC y PKA. La forma de Raf-1 activa fosforila, selectivamente, a las tres isoformas de MEK, que a su vez activan, selectivamente, a las cinasas ERK-1 y ERK-2 (revisado en Zhang, 1999).

Las cinasas MEK, que activan a ERK, constituyen una familia de cinasas de serina/treonina muy conservadas, que en mamíferos incluyen a tres isoformas homólogas e idénticas en un 85%; MEK-1a (44 kDa), MEK-1b (41 kDa) y MEK-2 (45 kDa).

El mecanismo de activación de MEK involucra su fosforilación en residuos de serina (Ahn, 1993). MEK es capaz de fosforilar a ERK-1 y ERK-2 en residuos de

treonina y tirosina en una reacción secuencial en donde la fosforilación de la tirosina precede a la de la treonina (Haysted, 1992)

Las cinasas ERK están involucradas en la regulación del reordenamiento del citoesqueleto y la morfología de la célula, el estallido respiratorio y la fagocitosis (Seger, 1995; Suchard, 1997; Raeder, 1999). Los sustratos conocidos de ERK incluyen proteínas asociadas a citoesqueleto, enzimas como PLC $\gamma$  y la PLA $_2$  (Seger, 1995); y factores de transcripción (Su, 1996).

### **II.3e La proteína Cinasa C y su papel en la fagocitosis**

La familia de las proteínas cinasas C (PKC), se compone de cinasas de serina/treonina que son activadas por diacilglicerol (DAG), fosfatidilserina (PS) y en el caso de algunas isoformas, por iones Ca $^{2+}$ .

Las PKC tienen como estructura general cuatro regiones conservadas (C1-C4) y cinco variables (V1-V5). Hacia el extremo amino terminal, precediendo al dominio C1, se encuentra una secuencia pseudosustrato con actividad autoinhibitoria ( $\psi$ S)(House, 1987). El dominio C1 tiene dos dedos de zinc (Hurley, 1997); mutaciones en este dominio dan evidencia de que éste es el sitio de unión del DAG (Kaibuchi, 1989). El dominio C2 es contiguo a C1 y tiene la capacidad de unir iones Ca $^{2+}$  (Shao, 1996). El dominio C2 de las PKC que no responden a calcio interactúa con proteínas que las ubican en regiones específicas de la membrana; estas proteínas son los receptores para PKCs activadas (RACKs) (Mochly-Rosen, 1995; Ron, 1995). Las regiones C3 y C4 junto con la región V4 forman el dominio catalítico. El dominio V5 juega un papel



importante para la localización subcelular de la enzima. Se piensa que V5 participa en interacciones proteína-proteína, pues productos generados a partir del gen PKC $\beta$ , que difieren únicamente en la secuencia V5, se localizan en distintos compartimientos membranales, PKC $\beta$ I en los microtúbulos mientras que PKC $\beta$ II en los gránulos secretorios (Kiley, 1995). Dependiendo del arreglo de los dominios, en la familia de PKC se distinguen 11 isoformas y dependiendo de su regulación se agrupan en subfamilias.

La subfamilia de PKC clásicas comprende a las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ I y  $\beta$ II y  $\gamma$ , que contienen todas las regiones conservadas y son activadas por fosfatidilserina (PS) de manera dependiente de calcio. También unen DAG, que incrementa la especificidad de la enzima por la PS y modula la afinidad por el calcio para situarla en el intervalo fisiológico (Takai, 1979). La subfamilia de PKC nuevas comprende a las isoformas  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\theta$ , que presentan la región V1 hacia la porción amino terminal junto a la región C1 rica en prolina, pero carecen de la región de unión a calcio. Estas isoformas son insensibles a calcio, pero son activadas por DAG en presencia de PS (Ono, 1988). La subfamilia de PKC atípicas comprende a las isoformas  $\iota$ ,  $\lambda$  y  $\zeta$ ; que carecen de la región C2 y de la mitad de la región C1. Estas isoformas son insensibles a calcio y no responden a DAG (Ono, 1989).

La actividad de PKC es necesaria para que se lleve a cabo la fagocitosis inducida por los Fc $\gamma$ R, pues al eliminar el contenido de PKC de la célula, incubándola por tiempos prolongados con ésteres de forbol, se inhibe la fagocitosis; y existe una fuerte correlación entre la cantidad de PKC eliminada y los valores de inhibición de la fagocitosis (Zheleznyak, 1992). Además, substratos de PKC como MARCKS y

MacMARCKS se acumulan en el área perifagosomal en la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R (Allen, 1996).

#### II.4 USO DE INHIBIDORES ENZIMÁTICOS PARA LA INVESTIGACIÓN DE LAS VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

El papel de una enzima en una vía de señalización puede estudiarse usando inhibidores selectivos. Por este motivo, se han aislado metabolitos activos de distintas fuentes y se ha probado su efecto en diferentes sistemas vivos. Un ejemplo de esto es el compuesto estaurosporina, un alcaloide aislado de *Streptomyces* sp. que es un potente inhibidor de las cinasas de la familia PKC (Tamaoki, 1986). Sin embargo, la estaurosporina carece de selectividad entre distintas cinasas, pues se ha observado que inhibe a las mismas concentraciones a cinasas dependientes de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (Cinasas II y III dependientes de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina) y a las dependientes de AMP-cíclico (cinasa cAK) (Davis 1989). A partir de su estructura, se sintetizaron compuestos que tuvieran un efecto más selectivo sobre las cinasas de la familia PKC, que no inhibieran la actividad de cinasas dependientes de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina ni las dependientes de AMP-cíclico, pero que actuara a las mismas concentraciones. Estos compuestos, pertenecientes a la familia de las bisindolilmaleimidias han mostrado su efectividad para inhibir selectivamente a las cinasas de la familia PKC tanto *in vitro* como *in vivo* (Dieter, 1991; Toullec, 1991; Séller, 1993; Kiss, 1995).

Los compuestos que pertenecen a la familia de las bisindolilmaleimidias, como Ro 31-8220 y GF 109203X, son inhibidores competitivos por el sitio de unión de ATP de

la enzima (Bit, 1993). Ro 31-8220 no muestra selectividad entre las isoformas de la enzima PKC $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_{II}$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$ , aisladas de cerebro de rata (Wilkinson, 1993). Sin embargo, GF 109203X inhibe a las isoformas clásicas a menores concentraciones que a las isoformas nuevas (Martiny-Baron, 1993). Ro 31-8220 y GF 109203X al ser probados en ensayos *in vitro* libres de células, presentaron distinto grado de inhibición sobre las formas citosólicas de PKC y formas asociadas a membrana. Ro 31-8220 es más selectivo para las formas asociadas a la membrana, pues la concentración a la cual inhibe al 50% la actividad ( $IC_{50}$ ) de PKC citosólicas es de  $0.048 \pm 0.006 \mu\text{M}$ , mientras que para PKC asociadas a la membrana, la  $IC_{50}$  es de  $0.0022 \pm 0.0002 \mu\text{M}$ . GF 109203X no muestra selectividad, presentando una  $IC_{50}$  igual para las formas citosólica y para las formas asociadas a la membrana de PKC, con valores de  $0.021 \pm 0.004 \mu\text{M}$  (Budworth, 1995).

Otro compuesto, un pigmento llamado curcumina, aislado del rizoma de *Curcuma longa*, que se ha usado en la medicina natural para el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Ammon, 1991) y se sabe que tiene actividad antioxidante (Huang, 1988; Kuo, 1996). Las propiedades fisicoquímicas de la curcumina, como su hidrofobicidad e inestabilidad en soluciones acuosas a pH >7 (Jaruga, 1998), predestinan a esta molécula a localizarse en la membrana celular donde los grupos fenólicos de la curcumina pueden ser esenciales para interactuar con puentes de hidrógeno (Joe, 1997).

La curcumina en ensayos *in vitro* libres de células inhibe la actividad de distintas fosfolipasas, pero es más eficiente para inhibir la actividad de la Fosfolipasa D, con una

IC<sub>50</sub> de 10  $\mu$ M. La curcumina a concentraciones de 50  $\mu$ M inhibe un 80% la actividad de PLD (Yamamoto, 1997).

La actividad de la Fosfatidilinositol 3-cinasa es inhibida eficientemente por el compuesto 2-(4-morfolinil)-8-fenilcromona (2-morfolino-8-fenil-4H-1-benzopireno-4), LY294002. Este compuesto inhibe completamente la actividad de la PI 3-K a concentraciones de 100  $\mu$ M en ensayos *in vitro* libres de células. LY294002 es un inhibidor competitivo por el sitio de unión a ATP (Vlahos, 1994). Este compuesto no inhibe a otras enzimas que requieren ATP para su actividad, incluyendo cinasas de proteínas, cinasas de lípidos y ATPasas.

PD98059 es un compuesto flavónico desarrollado por Alan Saltiel, que se une a la forma inactiva de MEK. La inhibición de la vía de ERK se da evitando que MEK sea activada por c-Raf y por otros activadores que estimulan a las MAP cinasas a través de MEK (Alessi, 1995; Dudley, 1995). PD98059 inhibe la activación de MEK a concentraciones micromolares y no inhibe su forma activa (las formas fosforiladas de MEK). Aunque la secuencia de aminoácidos de MEK2 es homóloga a MEK1 en un 90%, PD98059 es diez veces menos eficiente en prevenir la activación de MEK2 en estudios *in vitro* libres de células (Cohen, 1997).

### III. JUSTIFICACIÓN

Las respuestas mediadas por los FcγR son muy importantes para mantener el estado de homeostasis en el organismo. Estos receptores median distintos procesos que involucran, tanto al sistema inmunológico innato, como al sistema inmunológico adaptativo; como son la inflamación, la citotoxicidad dependiente de anticuerpo, la endocitosis y la fagocitosis. Por lo tanto, es importante determinar los mecanismos moleculares de la activación después de la unión a su ligando y entender así la función del receptor y las posibles vías de regulación celular.

Estos receptores no han sido tan estudiados como otros MIRRs. Por un lado, la heterogeneidad de receptores expresados por una misma célula, y el hecho de que estos reconocen al mismo ligando (agregados de IgG o partículas opsonizadas con IgG), han dificultado el análisis de las vías de activación inducidas por cada isoforma.

Por otro lado, los factores estructurales del ligando que son necesarios o críticos para inducir la activación a través de estos receptores han sido poco estudiados. Si bien se reconoce desde hace muchos años que la agregación es el evento necesario y suficiente para iniciar las cascadas intracelulares, no es clara la manera en que agregados distintos (en tamaño, multiplicidad, conformación, subclases de IgG) afectan este proceso.

En un intento de avanzar en el estudio de estos factores, se demostró una diferencia significativa en la capacidad de mediar fagocitosis entre IgG murinas de distintas subclases (IgG1 e IgG2b). Por los antecedentes del trabajo, se sabe que estas subclases tienen la misma capacidad para opsonizar la partícula y que éstas partículas

interaccionan en un número igual con la célula fagocítica; sin embargo, la partícula opsonizada con cada subclase no es fagocitada con la misma eficiencia en, al menos, dos líneas celulares distintas. Por tanto, se plantea que las diferencias observadas en la fagocitosis que inducen ambos anticuerpos se deben a la diversidad en propiedades de las IgG de distintos isotipos que producen diferencias cualitativas y cuantitativas en la activación de las enzimas involucradas en la fagocitosis. Para comprobar ésto se determinó el efecto de distintos inhibidores enzimáticos sobre la fagocitosis inducida por ambos subtipos de inmunoglobulina.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Las diferencias en la fagocitosis inducida por anticuerpos de la subclase IgG1 y por anticuerpos de la subclase IgG2b se deben a que cada uno presenta diferencias cualitativas y cuantitativas en la activación de las enzimas involucradas en la fagocitosis.

#### **V. OBJETIVOS**

##### Objetivo general

Determinar la participación de distintas enzimas intracelulares en la fagocitosis de partículas opsonizadas con anticuerpos de las subclases IgG1 e IgG2b.

##### Objetivos particulares

Con el uso de inhibidores enzimáticos específicos, dilucidar el papel de distintas enzimas en la vía de señalización que inducen la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con el anticuerpo 2C5 (IgG1) y con el anticuerpo 4F8 (IgG2b).

- Determinar el papel de:
  - La Fosfolipasa D, usando el inhibidor Curcumina.
  - La cinasa PI3-K, usando el inhibidor LY294002.
  - La cinasa MEK, usando el inhibidor PD98059.
  - La actividad de cinasas de la familia PKC, usando el inhibidor Ro 31-8220.
- \* Las isoformas clásicas y nuevas de la familia PKC, usando el inhibidor GF109203X.

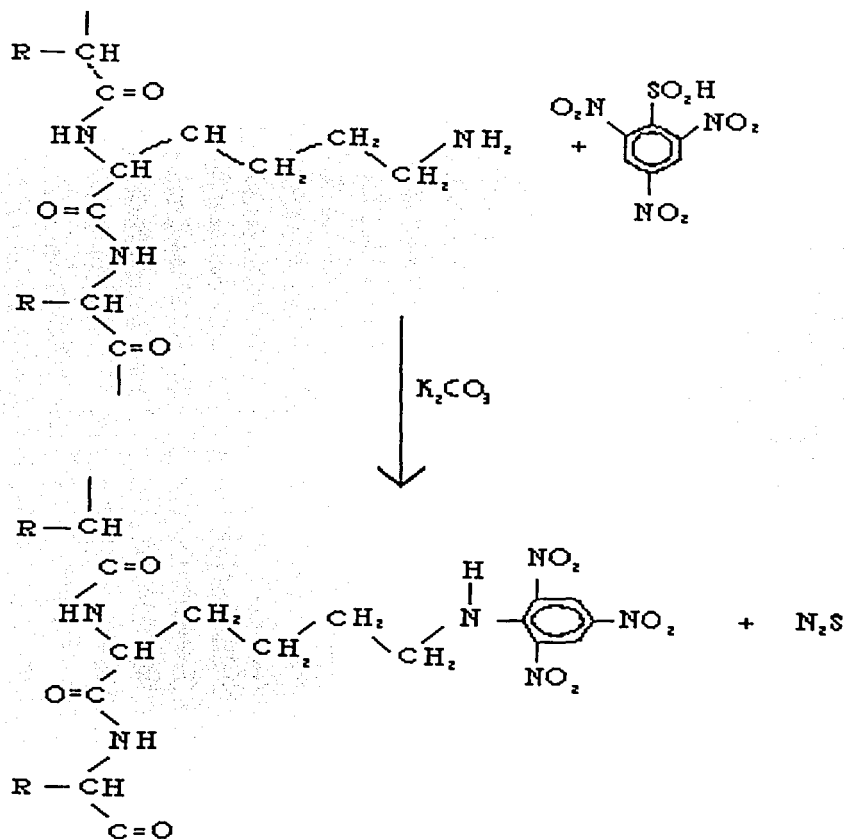
## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

**Cultivo celular.** Células (macrófagos) de la línea celular J774 se cultivaron en medio D-MEM (Gibco BRL, Grand Island, NY), en una atmósfera húmeda con 6% de CO<sub>2</sub> a 37°C. El medio D-MEM se preparó según las instrucciones del fabricante (GIBCO BRL, 1992). Para 1 litro de medio se disuelve el contenido de un sobre de medio en polvo en un litro de agua desionizada, agregando 3.7 gramos de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>). Se ajusta el pH a 7.1, se esteriliza por filtración y se guarda a temperatura ambiente y cubierto de la luz. Este medio se adicionó con distintos componentes según los requerimientos:

- Medio de cultivo D-MEM semicomplementado: el medio D-MEM estéril se complementó con L-glutamina (concentración final 2 mM), estreptomycin (0.01 mg/ml), penicilina-G (1 000 unidades/ml), aminoácidos no esenciales a una concentración final de 100 nM (Gibco BRL, Grand Island, NY) y piruvato de sodio a una concentración final de 0.1104 mg/ml (Gibco BRL, Grand Island, NY).
- Medio de cultivo D-MEM complementado: al medio de cultivo semicomplementado se le agregó 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island, NY), previamente inactivado por calor a 60°C por 30 minutos.
- Medio para los ensayos de viabilidad: En D-MEM sin rojo de fenol semicomplementado, se diluyó bromuro de 3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltretazolio (MTT) (Sigma, St. Louis, MO), a una concentración de 5 mg/ml.



**Sensibilización de eritrocitos de carnero con trinitrofenol (TNP).** Para estudiar la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R, se utilizó un sistema dinitrofenol (DNP) -antiDNP. Las células fagocitaron eritrocitos de carnero recubiertos de TNP que estaban opsonizados por IgG que reconocen como antígeno al DNP (los anticuerpos monoclonales 2C5 de la subclase IgG1 y el anticuerpo monoclonal 4F8 de la subclase IgG2b, son anticuerpos anti-DNP y presentan reactividad cruzada para TNP).



**Fig. 7** 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). Lara, 1996.

Los eritrocitos se sensibilizaron con 2,4,6,-trinitrofenol, TNP ( Eastman Kodak CO. Rochester, NY). Para marcar las proteínas de membrana de los eritrocitos con el hapteno TNP, se hacen reaccionar los grupos amino libres de las proteínas con el ácido 2, 4, 6- trinitrobencensulfónico en condiciones ligeramente alcalinas. Después de la reacción se libera un grupo sulfónico quedando el hapteno TNP unido covalentemente a las proteínas de membrana del eritrocito (Fig. 7). El procedimiento es el siguiente:

- Se toman 10 ml de eritrocitos de carnero en solución de Alsevers (100 mM dextrosa, 10 mM NaCl, 27 mM citrato Na 2H<sub>2</sub>O, 40 mM ácido cítrico H<sub>2</sub>O, pH 6-6.2, esterilizar por filtración).
- Se lavan por centrifugación con amortiguador de dextrosa (DGB<sup>2+</sup>; 0.05% gelatina, 2.5 mM ácido barbitúrico, 2.5% dextrosa, 75 mM NaCl, 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.5, esterilizar por filtración), para eliminar los restos de eritrocitos lisados.
- Se lava el paquete celular con amortiguador de boratos (200 mM ácido bórico, 150 mM NaCl, pH 8.5) y DGVB en la misma proporción (V/V), y se elimina el sobrenadante.
- Se adicionan 7 ml del amortiguador para sensibilizar (6.22 mg TNBS, 7 ml amortiguador de boratos), por cada mililitro de paquete celular.
- La suspensión de eritrocitos se cubre de la luz y se incuba por 10 minutos a temperatura ambiente en agitación constante.

- Se lavan los eritrocitos 1 vez con amortiguador de boratos y se elimina el sobrenadante. Para eliminar completamente el TNBS restante y los eritrocitos lisados se lavan con DGVB<sup>2+</sup>.
- Se mantienen a 4 °C en DGVB<sup>2+</sup>. A esta temperatura se pueden mantener hasta por una semana.

**Titulación de los anticuerpos anti-DNP (Hemaglutinación).** El método de hemaglutinación consiste en hacer diluciones seriadas del anticuerpo en pozos de fondo en V para microtitulación y luego agregar glóbulos rojos sensibilizados para observar la dilución máxima a la cual todavía hay aglutinación. El procedimiento a seguir es el siguiente:

- Se realizan diluciones seriadas (1:4) de los anticuerpos en DGVB<sup>2+</sup>. La concentración inicial de los anticuerpos es de 60 µg/ml.
- Se agrega un volumen igual al de la dilución del anticuerpo, de la suspensión al 1% de eritrocitos sensibilizados, se mezcla cuidadosamente. Al realizar este procedimiento la concentración inicial del anticuerpo será de 30 µg/ml.
- Se incuba a temperatura ambiente por 1 hora en una cámara húmeda.

La aglutinación de los eritrocitos sensibilizados indica la presencia de una concentración de anticuerpo lo suficientemente alta para permitir la formación de una malla y cuando la concentración es menor se formará un botón en el fondo del pozo. El título de hemaglutinación corresponde a la última dilución en la que aún se forma la malla.

**Opsonización de eritrocitos sensibilizados con TNP.** El procedimiento es el siguiente:

- Se lavan los eritrocitos sensibilizados por centrifugación con D-MEM no complementado y se suspenden al 2% en D-MEM.
- Se diluye el anticuerpo en D-MEM no complementado, al doble de la concentración hemaglutinante (1.875  $\mu\text{g/ml}$ ).
- Se mezclan la dilución del anticuerpo con los eritrocitos sensibilizados, obteniendo una suspensión al 1 % de eritrocitos y se incuban en agitación constante a temperatura ambiente por 30 minutos.
- Se lavan tres veces con D-MEM no complementado y se resuspenden en la misma solución obteniendo una suspensión al 1 % de eritrocitos opsonizados.

**Fagocitosis por la técnica de Diaminobencidina.** En el laboratorio se estandarizó una técnica colorimétrica para cuantificar la fagocitosis, basada en el método de Jungi (Jungi, 1985). Esta técnica se basa en la actividad de pseudoperoxidasa que posee la hemoglobina, la cual desarrolla un compuesto colorido en presencia de 3,3-diaminobencidina, DAB (Sigma, St. Louis, MO) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Merck, Darmstadt, Alemania). Esta reacción colorida puede ser cuantificada espectrofotométricamente. El procedimiento a seguir es el siguiente:

- Se siembran  $4 \times 10^4$  células J774 por pozo en una placa de cultivo de 96 pozos en D-MEM complementado y se incuban en atmósfera húmeda con 6% de  $\text{CO}_2$  a 37 °C por 24 horas. Pasado este tiempo las células se duplican

de manera que a las 24 horas hay aproximadamente  $8 \times 10^4$  células por pozo.

- Las monocapas de células se lavan 2 veces con medio semicomplementado y se agregan 100  $\mu$ l de medio complementado.
- Por cada pozo se agregan 30  $\mu$ l de la suspensión al 1% de eritrocitos opsonizados (como ya se describió) y se incuban durante 50 minutos a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>.
- Para eliminar los eritrocitos que no fueron internalizados, pasado el tiempo de incubación, las células se lavan con agua destilada por 20 segundos en agitación suave. Después se realizan tres lavados con amortiguador de fosfatos (PBS 20X; 2.6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 7.74 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro, 0.16 mM NaCl, pH 7.5).
- Las células J774 se lisan con 100  $\mu$ l/pozo de SDS (Bio-Rad. Richmond, CA) al 0.3% en PBS.
- Las placas se incuban a temperatura ambiente en agitación constante por 30 minutos. Pasado ese tiempo se adicionan 200  $\mu$ l/pozo del sustrato DAB (1.5 mg de DAB, 15  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 5 ml de PBS).
- Las placas se incuban a temperatura ambiente en agitación constante por 1 minuto.
- Se determina la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro (Microplate Reader; BIO-RAD Richmond, CA)

- En los experimentos individuales, cada condición experimental se realizó por triplicado y los datos de cada experimento se manejaron como la media +/- la desviación estándar.

**Tratamientos con los inhibidores.** Para investigar el efecto de los distintos inhibidores sobre la fagocitosis, las células se sembraron siguiendo el protocolo de fagocitosis y se lavaron en la misma forma, pero se mantuvieron en medio semicomplementado, para la incubación con cada inhibidor. Al final del tiempo de incubación se continuó con el protocolo de fagocitosis o bien de viabilidad por el método de MTT (ver mas adelante).

Los intervalos de concentraciones y los tiempos de incubación usados para cada inhibidor se propusieron a partir de datos reportados por otros grupos de trabajo. Las diluciones de cada inhibidor se realizaron en medio semicomplementado; cada inhibidor se incubó con las células en una atmósfera húmeda con 6% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Después de la incubación en presencia del inhibidor respectivo, se determinó la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con la concentración hemaglutinante de los anticuerpos 2C5 y 4F8, en presencia continua del inhibidor.

Las concentraciones que se usaron de inhibidor y el tiempo de incubación de cada uno, fueron los siguientes:

- Para el inhibidor Curcumina (Calbiochem-Novabiochem CO. La Jolla, CA), se probaron las concentraciones 5, 10, 15, 25, 35 y 50  $\mu\text{M}$ , incubando a las células con el inhibidor por una hora (Huang, 1988; Yamamoto, 1997; Singh, 1995).

- Para el inhibidor LY294002 (Calbiochem-Novabiochem CO. La Jolla, CA), se probaron las concentraciones 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80  $\mu\text{M}$  (Cowen, 1996; Cox, 1999; Eder, 1998; Gillooly, 1999; Gratacap, 1998; Rameh, 1998; Vlahos, 1994), enseguida de adicionar el inhibidor se continuo con el protocolo de fagocitosis.
- Para el inhibidor PD98059 (New England Biolabs, Inc. Beverly, MA), se probaron las concentraciones 1, 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ , incubando a las células con el inhibidor por una hora (Brack, 1998; Alessi, 1995; Lin, 1993).
- Para el inhibidor Ro 31-8220 (Calbiochem-Novabiochem CO. La Jolla, CA), se probaron las concentraciones 5, 10, 15 y 25  $\mu\text{M}$ , incubando a las células con el inhibidor por una hora (Eason, 1995; Trachsel, 1995; Chen, 1998).
- Para el inhibidor GF109203X (Calbiochem-Novabiochem CO. La Jolla, CA), se probaron las concentraciones 1, 5, 10, 15 y 20  $\mu\text{M}$ , incubando a las células con el inhibidor por 30 minutos (Toullec, 1991; Kiss, 1995; Vernhet, 1997; Wilkinson, 1993).

**Ensayo de viabilidad por el método de bromuro de 3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltretazolio (MTT).** Después de tratar a las células con cada uno de los inhibidores por los tiempos de incubación indicados, se determinó la viabilidad celular midiendo espectrofotométricamente la cantidad de azul de formazan reducido a partir del bromuro de 3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltretazolio, MTT; la cantidad de producto colorido es proporcional al número de células viables (Hansen, 1989; Ferrari, 1990). Esta técnica se basa en la capacidad de las enzimas mitocondriales de las células viables para

transformar el MTT en un compuesto colorido, descrita por Mosmann en 1983. La técnica original ha sufrido algunas modificaciones con el objeto de solubilizar las sales de azul de formazan (Hansen, 1989; Sladowski, 1993). En nuestro trabajo el procedimiento empleado fue el siguiente:

- Después de la incubación por el tiempo indicado para cada inhibidor, el medio se retiró y las células se lavaron dos veces con medio semicomplementado.
- Se agregaron alícuotas de 50  $\mu$ l por pozo del medio para ensayos de viabilidad y se incubaron por 2 horas en una atmósfera húmeda con 6% de CO<sub>2</sub> a 37°C.
- Se retiró el medio por aspiración.
- Se dejó evaporar a temperatura ambiente por 30 minutos, en una campana de extracción de gases (los gases de MTT son tóxicos).
- Se agregaron 100  $\mu$ l por pozo de la solución de extracción.
- Se selló la placa e incubó toda la noche a 37°C en una cámara húmeda
- Se determinó la absorbancia a 570 nm en un lector de ELISA (Microplate Reader)



## VII. RESULTADOS

**La fagocitosis de eritrocitos opsonizados con el anticuerpo 2C5 es menor que la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con el anticuerpo 4F8.** Datos previos indicaron que los monoclonales anti-DNP 4F8 (IgG2b) y 2C5 (IgG1), tienen eficiencias distintas para mediar fagocitosis (Garay, 1994). Esto puede tener varias explicaciones: que existan diferencias de unión entre la inmunoglobulina y el hapteno, que se traducen en una capacidad distinta para opsonizar; o que existan diferencias de unión entre la inmunoglobulina y el receptor, que se traducen en una capacidad distinta para activar a la célula.

Las diferencias en la fagocitosis no pueden ser explicadas por diferencias en la afinidad de la unión de cada inmunoglobulina por el hapteno, como se demostró en ensayos de afinidad por DNP-lisina usando el método de apagamiento de fluorescencia (Garay, 1994). Tampoco se han encontrado diferencias en la capacidad de los anticuerpos para mediar la unión del eritrocito opsonizado a la célula (Garay, 2002; comunicación personal). Algunos resultados experimentales indican que el Fc $\gamma$ RI une IgG2a e IgG2b con alta afinidad y que tanto el Fc $\gamma$ RII como el Fc $\gamma$ RIII unen con mayor afinidad a IgG2a e IgG2b que a IgG1 (Unkeless, 1988). Sin embargo, hay resultados contradictorios al respecto, que se deben a las dificultades técnicas que plantea el trabajar con receptores de baja afinidad, como son los receptores para IgG ( $K_a$   $10^7$ - $10^8$  M $^{-1}$  para Fc $\gamma$ RI y menores para Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. Daëron, 1997). Para sortear este problema se determinó la interacción efectiva entre la inmunoglobulina y el receptor usando un sistema celular. En ensayos de rosetas se observó que los eritrocitos

opsonizados con cada subclase se unían en igual número a los receptores presentes en la membrana celular (Fig. 1)(Garay, 1994).

Con la finalidad de reproducir estos datos, realizamos ensayos de fagocitosis empleando a la línea celular J774, que es una línea celular de macrófagos de origen murino. Las células J774 fueron estimuladas con eritrocitos opsonizados con cada anticuerpo, usando un intervalo de concentración entre 0.004 y 30  $\mu\text{g/ml}$  o bien con eritrocitos sólo sensibilizados. La contribución a la fagocitosis de los receptores que no dependen de opsoninas fue evaluada exponiendo a los macrófagos a eritrocitos sensibilizados. El valor de la fagocitosis de eritrocitos sensibilizados fue sólo el 7% del valor máximo que se obtuvo cuando los eritrocitos fueron opsonizados con 4F8. La diferencia entre la fagocitosis de eritrocitos opsonizados y de eritrocitos sensibilizados (fagocitosis no específica), corresponde a la respuesta fagocítica mediada por los  $\text{Fc}\gamma\text{R}$ .

La fagocitosis de eritrocitos opsonizados con el anticuerpo 2C5 a la concentración de 30  $\mu\text{g/ml}$ , fue de sólo el 38% de la fagocitosis que se obtuvo a la misma concentración del anticuerpo 4F8 (Fig. 8). Este fue el valor máximo de fagocitosis obtenida con este anticuerpo, aún a concentraciones mayores (no se muestran los datos).

De aquí en adelante, los valores de porcentaje que se presentan son relativos al valor máximo obtenido con cada anticuerpo, eliminando primero el valor de la fagocitosis no específica y tomando como valor máximo los valores de fagocitosis obtenida con macrófagos incubados sólo con el vehículo. Durante el tratamiento de los datos, para poder tomar como el valor máximo la fagocitosis obtenido en las células que fueron tratadas con DMSO, se demostró que la inhibición de la fagocitosis durante los

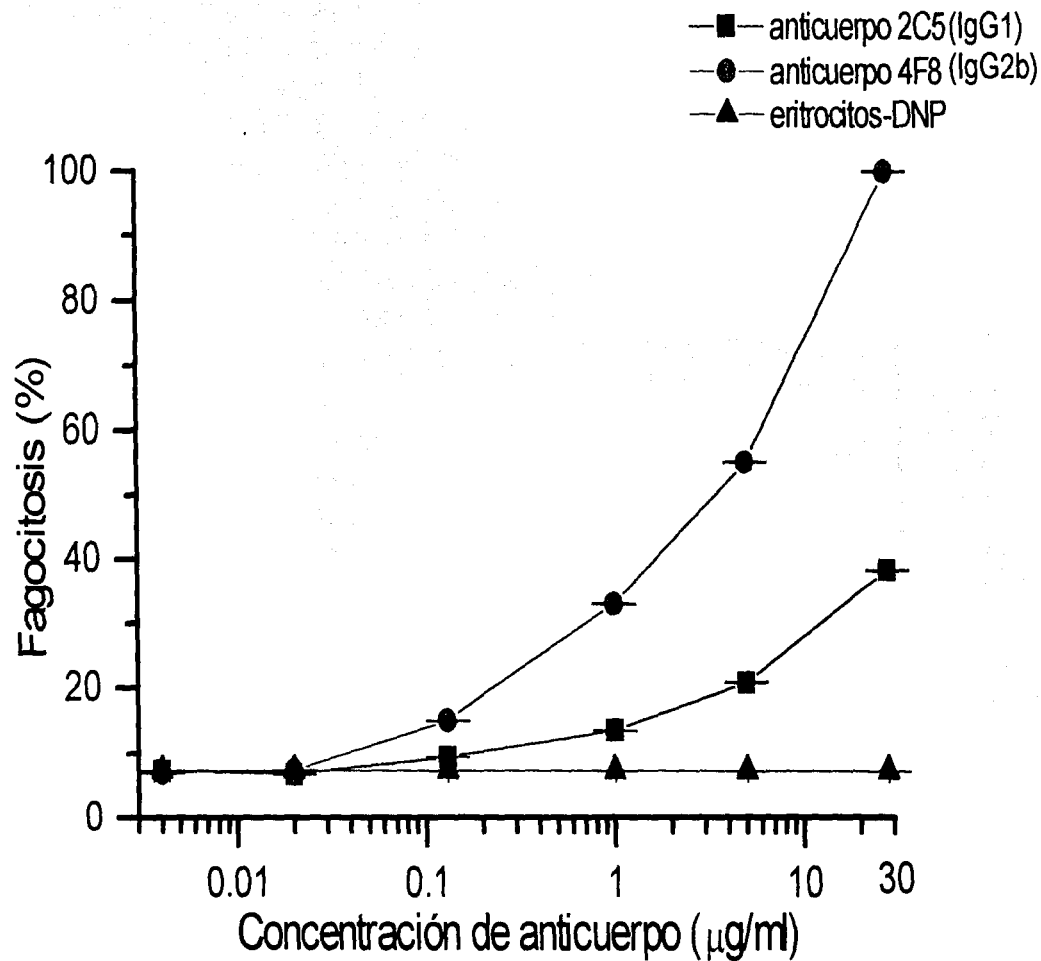


Fig. 8. La fagocitosis inducida por el anticuerpo monoclonal 2C5 es menor a la inducida por el anticuerpo monoclonal 4F8. Células J774 fueron incubadas con eritrocitos de carnero opsonizados con los anticuerpos 4F8 y 2C5 en el intervalo de 0.003 a 30 µg/ml, por 50 minutos a 37° C. Las células también fueron incubadas con eritrocitos sensibilizados (eritrocitos-DNP) para distinguir la respuesta fagocítica no mediada por los Fc $\gamma$ R. Los datos se expresan como porcentaje del valor máximo de fagocitosis obtenido con el anticuerpo 4F8. Los datos son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

ensayos realizados con los inhibidores, no se debe al efecto del vehículo, pues en ninguna de las concentraciones usadas la fagocitosis disminuyó en más de un 10% (Fig. 9). Los valores que se muestran corresponden a los valores de fagocitosis obtenidos en células tratadas con la concentración mayor de DMSO usada para cada inhibidor. De esta manera, sólo se reporta el efecto del inhibidor sobre la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R.

Para poder afirmar que el efecto observado sobre la fagocitosis se debía a la inhibición de las distintas enzimas y no a una disminución en la viabilidad celular causada por el tratamiento con los inhibidores, se realizaron ensayos de viabilidad, midiéndose la cantidad de producto colorido formado a partir de la reducción de MTT; esta técnica es muy sensible a toxicidad celular, pues permite cuantificar daño en las mitocondrias (Hansen, 1989). En la figura 10, se muestran los efectos de las concentraciones máximas de inhibidores y de vehículo, sobre la viabilidad de las células. En los tratamientos con Ro 31-8220 (RO) y con curcumina (CU) hay una disminución de aproximadamente el 10% de la viabilidad.

**La inhibición de la enzima PLD disminuye en aproximadamente 20% la fagocitosis inducida por ambas subclases.** La PLD es activada durante la endocitosis de complejos inmunes. Su actividad se requiere para mantener niveles óptimos de fagocitosis y para que se lleve a cabo el tráfico vesicular (Gewirtz, 1997; Suchard, 1997; Meléndez, 1998). También es activada con el entrecruzamiento del Fc $\gamma$ RI (Kusner, 1999). Sin embargo, su activación no es necesaria para los arreglos del citoesqueleto necesarios para la fagocitosis (Lennartz, 1999).

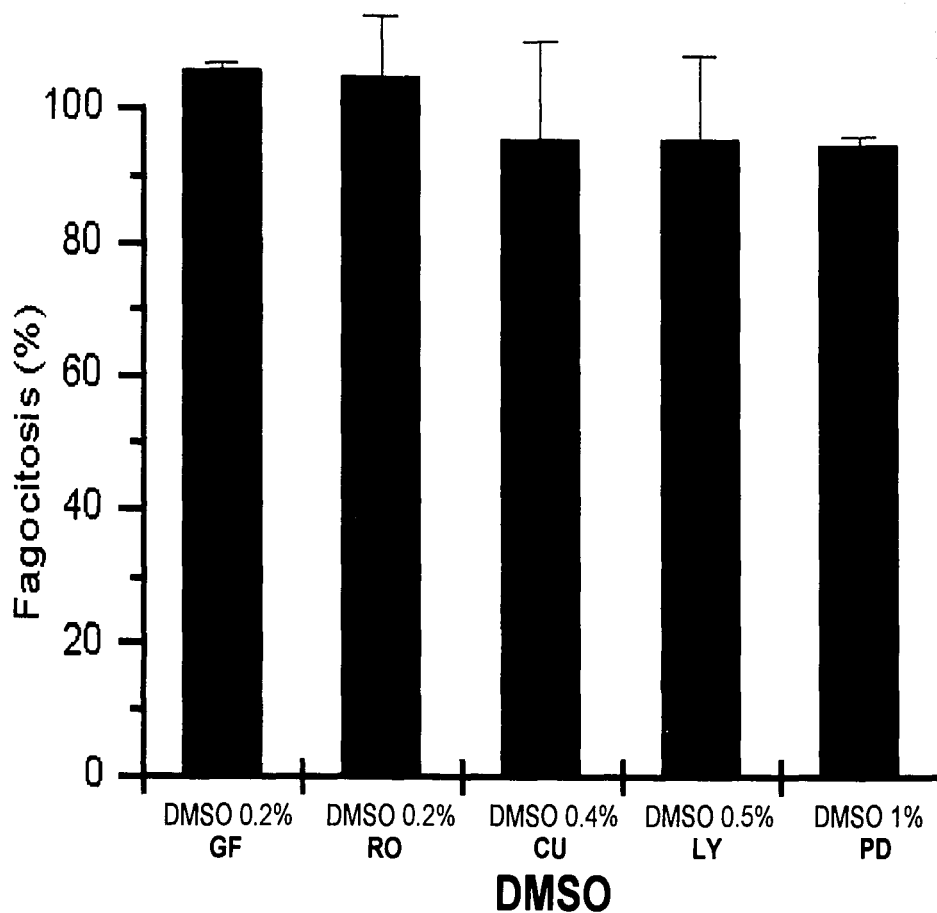


Fig. 9. La inhibición de la fagocitosis no se debe al efecto del vehículo. Las células J774 se trataron con la concentración del disolvente dimetilsulfóxido (DMSO) correspondiente al usado con la concentración mayor de cada inhibidor [GF109203X (GF), Ro 31-8220 (RO), Curcumina (CU), LY294002 (LY), PD98059 (PD)]. Pasado el tiempo de incubación, las células J774 se mezclaron con eritrocitos sensibilizados u opsonizados con el anticuerpo 4F8 a una concentración hemaglutinante (1.875  $\mu\text{g/ml}$ ). Las células y los eritrocitos se incubaron por 50 minutos a 37° C. Los datos se expresan como el porcentaje del valor de absorbancia a 490 nm de la fagocitosis de eritrocitos opsonizados en ausencia del vehículo. Los datos son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

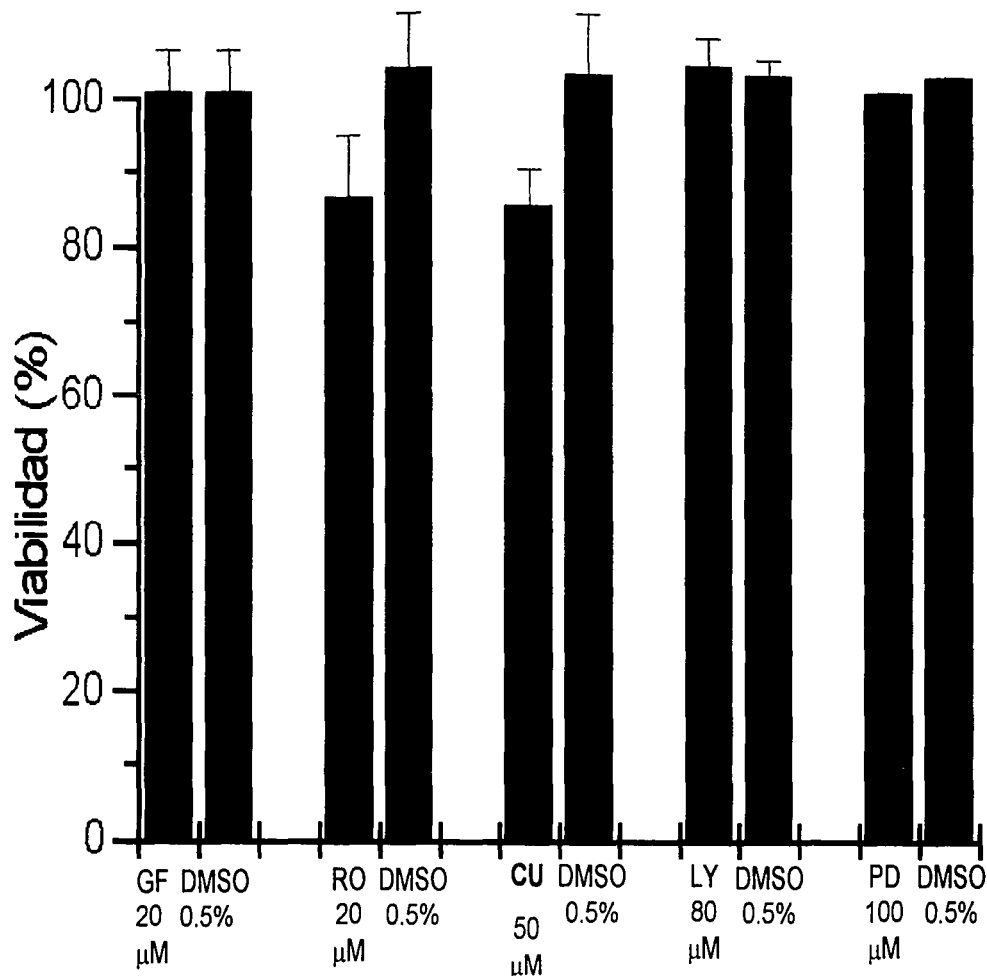


Fig. 10. La disminución en la viabilidad celular no explica las diferencias observadas en la fagocitosis. Las células J774 se trataron con la concentración mayor de inhibidor usada durante los ensayos de inhibición de la fagocitosis y a los tiempos indicados en el texto o bien sólo con el volumen correspondiente del disolvente dimetilsulfóxido (vehículo). Pasado el tiempo de incubación el sobrenadante se eliminó y se agregó el medio para ensayos de viabilidad, que contiene MTT. Las células J774 se incubaron en este medio por 2 horas a 37° C. Los datos se expresan como el porcentaje del valor máximo de viabilidad obtenido con cada uno de los inhibidores o con volumen correspondiente del vehículo. Los datos son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos.

Por el papel regulador de la PLD, decidimos analizar a esta enzima en la fagocitosis inducida por los anticuerpos 4F8 y 2C5. Para ello utilizamos el compuesto curcumina, que se ha reportado inhibe en un 50% la actividad de PLD a la concentración de 10  $\mu$ M (Yamamoto, 1997).

Las células J774 fueron tratadas por 30 minutos con distintas concentraciones del inhibidor curcumina (5, 10, 15, 25, 35 y 50  $\mu$ M), o bien sólo con el vehículo DMSO (Fig. 11).

Las células tratadas fueron estimuladas con eritrocitos opsonizados con cada anticuerpo, usando para ambos la concentración hemaglutinante (1.875  $\mu$ g/ml) o bien con eritrocitos sensibilizados. La fagocitosis de eritrocitos opsonizados con el anticuerpo 2C5 fue inhibida en aproximadamente un 15% en todo el intervalo de concentraciones usadas con el inhibidor. La fagocitosis de eritrocitos opsonizados con el anticuerpo 4F8 fue inhibida de manera dosis dependiente; con un máximo de inhibición del 20% cuando se utilizó la concentración más alta (Fig. 11).

**La inhibición de la enzima PI3K tiene distinto efecto sobre la fagocitosis inducida por cada anticuerpo.** La estimulación a través del Fc $\gamma$ RI activa a las PI3K (Indik, 1995; Meléndez, 1998). Durante la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R se requiere de la actividad de PI3K (Toker, 1997; Indik, 1995; Nonomiya, 1994; Crowlwy, 1997; Araki, 1996). La actividad de esta enzima permite la extensión de los seudópodos y los eventos que se requieren para promover la fusión de membranas, incluyendo aquellos que acompañan la fagocitosis. Además, tanto la actividad de PI3K como sus productos determinan la localización y activación de un amplio intervalo de moléculas involucradas

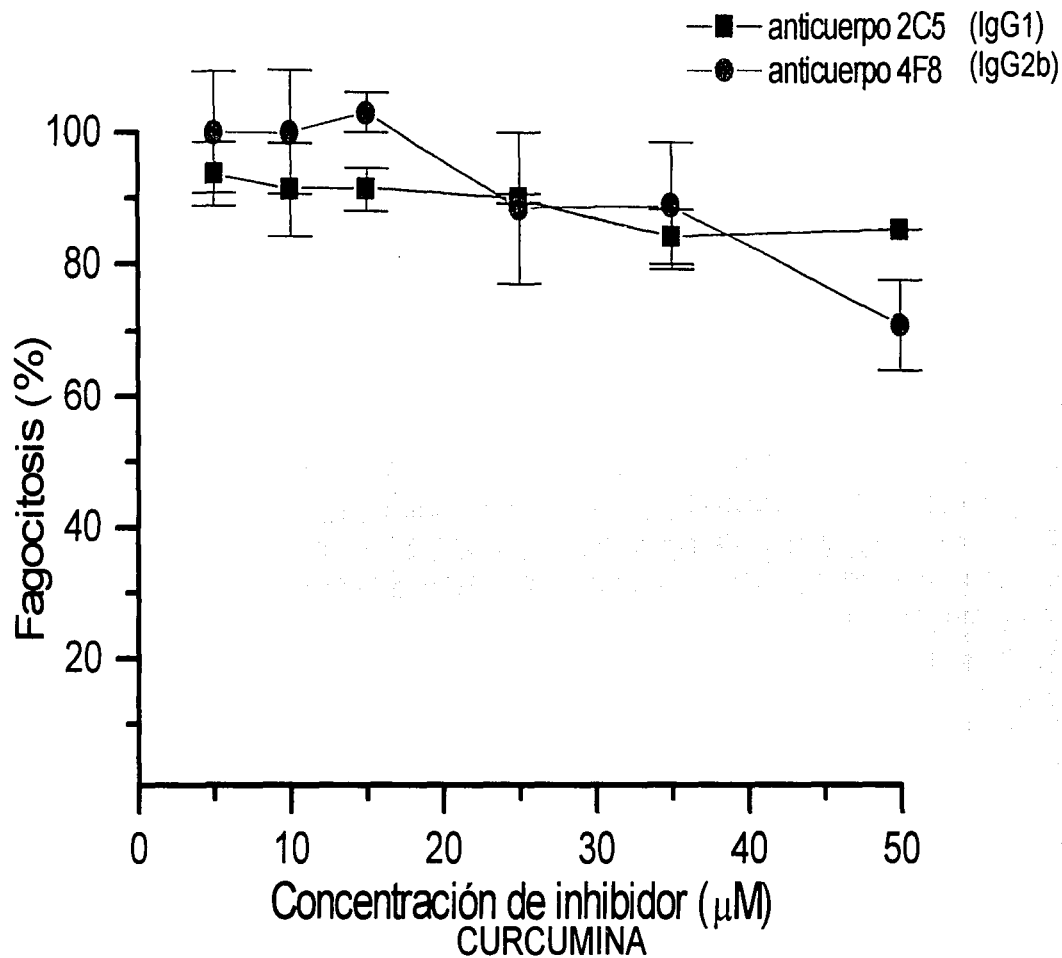


Fig. 11. Efecto del inhibidor Curcumina sobre la fagocitosis mediada por  $Fc\gamma R$ . Células J774 se trataron con distintas concentraciones del inhibidor Curcumina: 5, 10, 15, 25, 35 y 50  $\mu M$  por 30 minutos, o bien sólo con el disolvente dimetilsulfóxido (DMSO), antes de mezclarlas con eritrocitos sensibilizados u opsonizados con los anticuerpos 4F8 y 2C5 a una concentración hemaglutinante (1.875  $\mu g/ml$ ). Las células J774 y los eritrocitos se incubaron por 50 minutos a 37° C. Los datos se expresan como el porcentaje del valor máximo de fagocitosis obtenido con cada uno de los anticuerpos, en ausencia del inhibidor, pero en presencia del vehículo. Los datos son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 4 experimentos independientes.



en la señalización intracelular (Kapeller, 1994; Araki, 1996; Reif, 1996; Lennartz, 1997; Toker, 1997). Por lo anterior, se plantea que la actividad de PI3K se requiere durante los primeros eventos que conducen a la fagocitosis; por lo que decidimos inhibir a esta enzima para determinar el efecto sobre la fagocitosis inducida por los anticuerpos 4F8 y 2C5.

Para ello utilizamos el compuesto LY294002, que inhibe la actividad de PI3K en un 50% a la concentración de 1.5  $\mu\text{M}$  en ensayos *in vitro* libres de células (Vlahos, 1994).

Las células J774 fueron tratadas con distintas concentraciones del inhibidor LY294002 (2.5, 5, 10, 20, 40 y 80  $\mu\text{M}$ ), o con el vehículo DMSO (Fig. 12). Las células tratadas fueron estimuladas con eritrocitos opsonizados con cada anticuerpo, usando para ambos la concentración hemaglutinante de 1.875 $\mu\text{g/ml}$  o con eritrocitos sensibilizados. La fagocitosis de eritrocitos opsonizados con el anticuerpo 2C5, al igual que con el anticuerpo 4F8, fue inhibida de manera dosis dependiente (Fig. 12), pero los valores máximos de inhibición para cada anticuerpo fueron distintos. El valor máximo de inhibición para el anticuerpo 2C5 fue de 80%, mientras que para el anticuerpo 4F8 fue del 100%. La concentración a la cual se alcanza el 50% de inhibición de la fagocitosis ( $\text{IC}_{50}$ ) también fue distinta. Para el anticuerpo 2C5 la  $\text{IC}_{50}$  fue de 25  $\mu\text{M}$ ; mientras que para el anticuerpo 4F8 fue de 5  $\mu\text{M}$ .

**La actividad de las enzimas MEK1/2 es necesaria durante la fagocitosis inducida por ambas subclases.** Se ha demostrado que el entrecruzamiento de los  $\text{Fc}\gamma\text{R}$  activa a las MAPK (Rose, 1997; Durden, 1995). Se sabe que se requiere de la

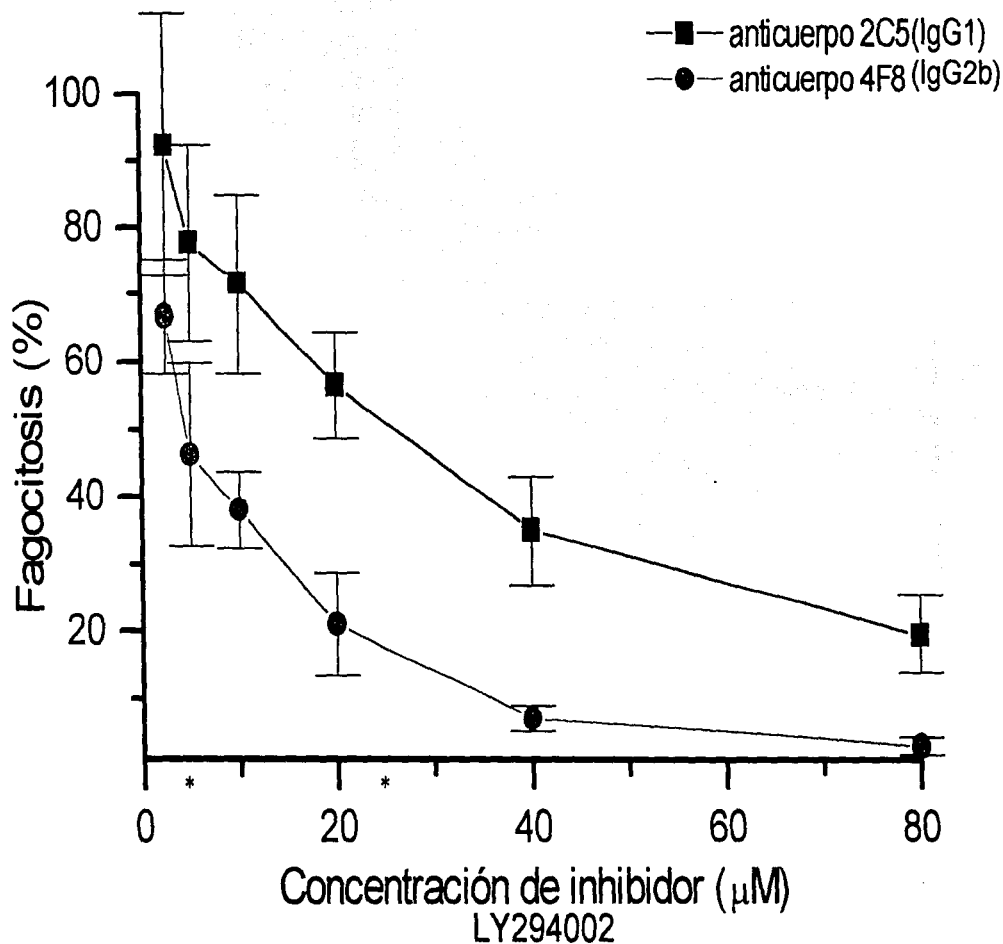


Fig. 12. Efecto del inhibidor LY294002 sobre la fagocitosis mediada por Fc $\gamma$ R. Células J774 se trataron con distintas concentraciones del inhibidor LY294002: 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80  $\mu$ M o bien sólo con el disolvente dimetilsulfóxido (DMSO), enseguida se mezclaron con eritrocitos sensibilizados u opsonizados con los anticuerpos 4F8 y 2C5 a una concentración hemaglutinante (1.875  $\mu$ g/ml). Las células J774 y los eritrocitos se incubaron por 50 minutos a 37° C. Los datos se expresan como el porcentaje del valor máximo de fagocitosis obtenido con cada uno de los anticuerpos, en ausencia del inhibidor, pero en presencia del vehículo. Los datos son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 4 experimentos independientes.

\* Concentración en la cual la fagocitosis se inhibe en un 50%.

actividad de las MAPK, ERK1 y ERK2, durante la internalización de partículas opsonizadas con IgG (Suchard, 1997; McLeish, 1998; Reader, 1999; Mansfield, 2000). Se ha observado que ERK2 esta involucrada en la activación de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), que se requiere durante la internalización de partículas opsonizadas con IgG (Mansfield, 2000). Por lo tanto, decidimos determinar el papel de esta enzima en la fagocitosis inducida por los anticuerpos 4F8 y 2C5.

Se sabe que el compuesto PD98059 inhibe en un 50% la actividad de MEK1 a concentraciones de 5-10  $\mu\text{M}$  en ensayos *in vitro* libres de células. PD98059 en los mismos ensayos también inhibe a MEK2 en un 50% a concentraciones de 50  $\mu\text{M}$ . Este compuesto es capaz de inhibir en su totalidad la actividad de las MAPK (Dudley, 1995; Pang, 1995; Alessi, 1995). Sin embargo, aún con el tratamiento de este inhibidor, algunos estímulos mantienen actividad residual de MEK suficiente para activar la cascada de MAPK (Alessi, 1995).

Las células J774 fueron tratadas por 1 hora con distintas concentraciones del inhibidor PD98059 (1, 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ), o sólo con el vehículo DMSO (Fig. 13). Las células tratadas se estimularon con eritrocitos opsonizados con cada anticuerpo, usando para ambos la concentración hemaglutinante de 1.875  $\mu\text{g/ml}$ , o con eritrocitos sensibilizados. La fagocitosis de eritrocitos opsonizados con el anticuerpo 2C5, al igual que con el anticuerpo 4F8, se inhibió de manera dosis dependiente con un máximo de inhibición del 80% (Fig. 13). La concentración a la que se obtuvo el 50% de inhibición de la fagocitosis ( $\text{IC}_{50}$ ) inducida por ambos anticuerpos fue de 30  $\mu\text{M}$ .

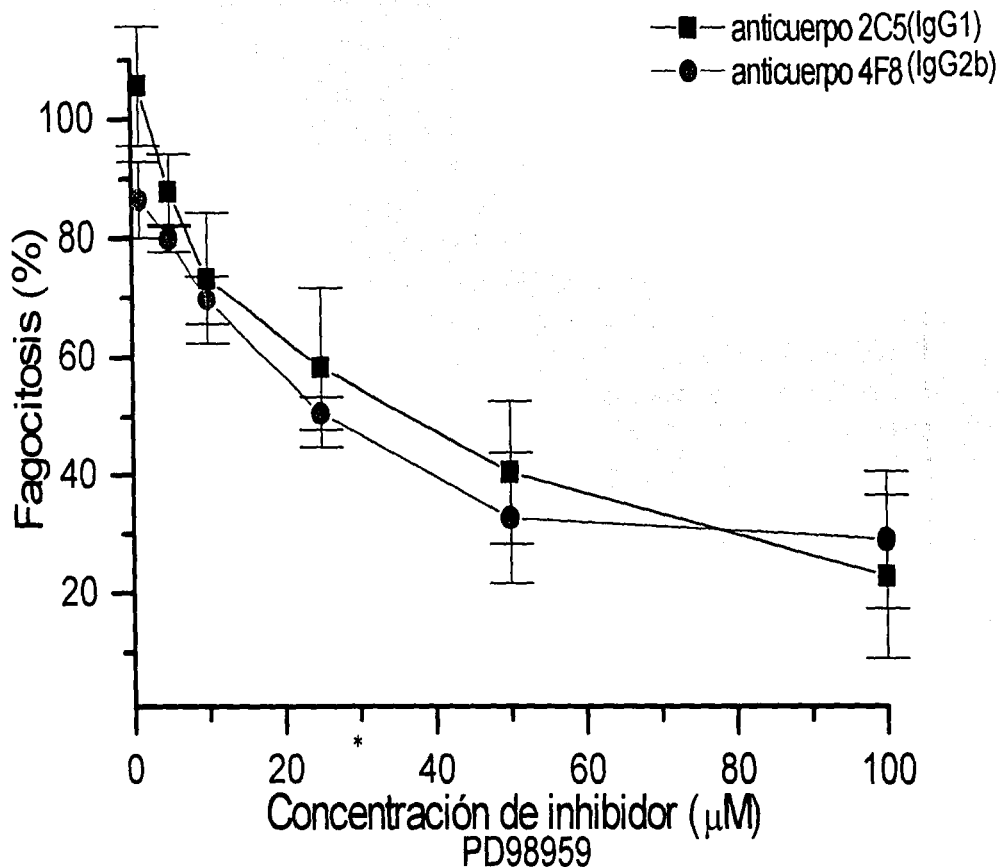


Fig. 13. Efecto del inhibidor PD98059 sobre la fagocitosis mediada por  $Fc\gamma R$ . Células J774 se trataron con distintas concentraciones del inhibidor PD98059: 1, 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu M$  por 1 hora, o bien sólo con el disolvente dimetilsulfóxido (DMSO), antes de mezclarlas con eritrocitos sensibilizados u opsonizados con los anticuerpos 4F8 y 2C5 a una concentración hemaglutinante (1.875  $\mu g/ml$ ). Las células J774 y los eritrocitos se incubaron por 50 minutos a 37° C. Los datos se expresan como el porcentaje del valor máximo de fagocitosis obtenido con cada uno de los anticuerpos, en ausencia del inhibidor, pero en presencia del vehículo. Los datos son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 4 experimentos independientes.

\* Concentración en la cual la fagocitosis se inhibe en un 50%

**La inhibición de la actividad de PKC disminuye de manera dosis dependiente la fagocitosis inducida por ambos anticuerpos.** Durante la fagocitosis se ha demostrado que PKC se acumula en la vecindad del fagosoma (Allen, 1996). Las fracciones aisladas de membrana fagosomal de monocitos están enriquecidas con PKC (revisado en Kwiatkowska, 1999). Durante la fagocitosis mediada por los Fc $\gamma$ R, se ha observado que la cantidad de PKC asociada a la membrana que está en contacto con partículas opsonizadas con IgG se incrementa, aproximadamente, en dos veces antes de que ocurra la internalización de la partícula (Zheleznyak, 1992). Dado que la actividad de PKC se ha asociado a la estimulación de los Fc $\gamma$ R, nos propusimos analizar a esta enzima en la fagocitosis inducida por los anticuerpos 4F8 y 2C5.

Para ello utilizamos dos compuestos: el compuesto Ro 31-8220 y el compuesto GF109203X. Se sabe que Ro 31-8220 inhibe la actividad de PKC a concentraciones entre 5-27 nM en ensayos *in vitro* libres de células (Wilkinson, 1993). El compuesto GF109203X inhibe la actividad de PKC clásicas a concentraciones menores que las concentraciones a las que inhibe a PKC nuevas (Larsen, 2000). Las células J774 fueron preincubadas por 1 hora con distintas concentraciones del inhibidor Ro 31-8220 (5, 10, 15 y 20  $\mu$ M) o sólo vehículo (Fig. 14); o por 30 minutos con distintas concentraciones del inhibidor GF109203X (1, 3, 5, 10, 15 y 20  $\mu$ M) o solo con el vehículo DMSO (Fig. 15). Las células tratadas se estimularon con eritrocitos opsonizados con cada anticuerpo, usando la concentración hemaglutinante 1.875  $\mu$ g/ml o con eritrocitos sensibilizados.

Cuando las células se trataron con el inhibidor R0 318220, la fagocitosis inducida por ambos anticuerpos se inhibió de manera dosis dependiente. A la concentración de

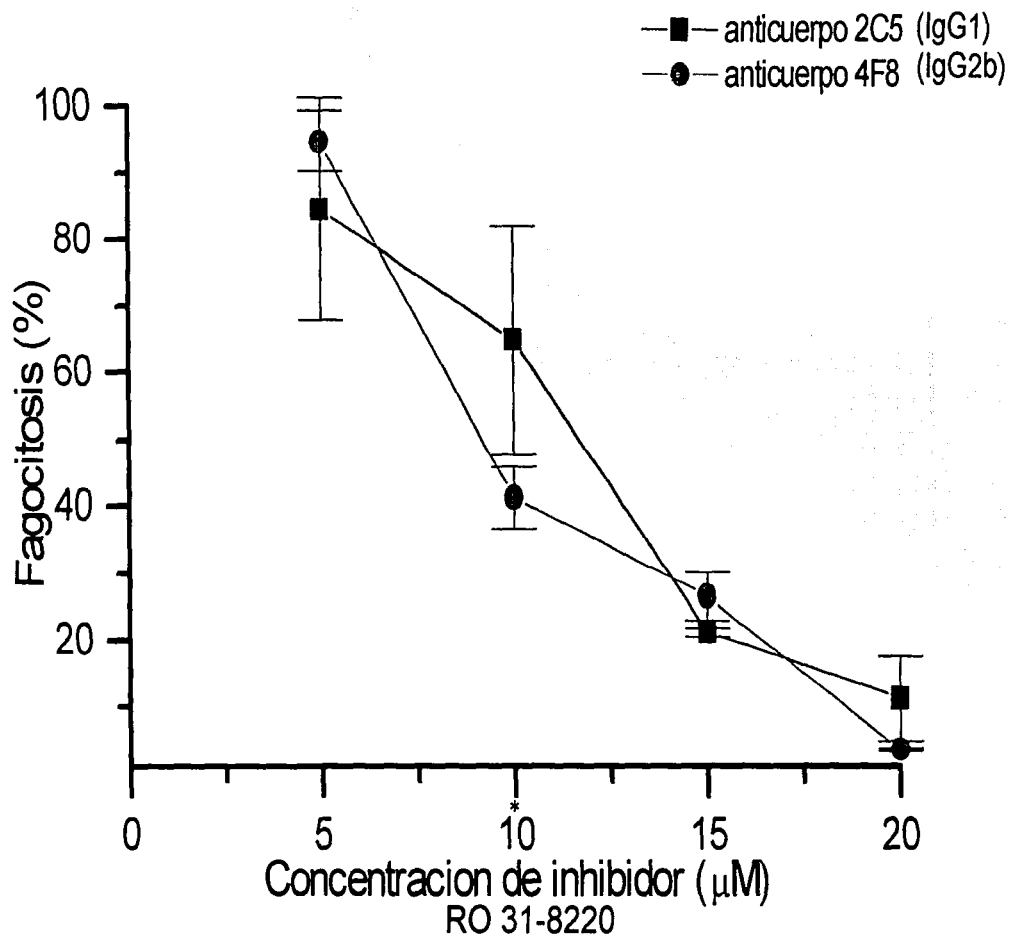


Fig. 14. Efecto del inhibidor Ro 31-8220 sobre la fagocitosis mediada por Fc $\gamma$ R. Células J774 se trataron con distintas concentraciones del inhibidor Ro 31-8220: 5, 10, 15 y 20  $\mu$ M por 1 hora, o bien sólo con el disolvente dimetilsulfóxido (DMSO), antes de mezclarlas con eritrocitos sensibilizados u opsonizados con los anticuerpos 4F8 y 2C5 a una concentración hemaglutinante (1.875  $\mu$ g/ml). Las células J774 y los eritrocitos se incubaron por 50 minutos a 37° C. Los datos se expresan como el porcentaje del valor máximo de fagocitosis obtenido con cada uno de los anticuerpos, en ausencia del inhibidor, pero en presencia del vehículo. Los datos son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 4 experimentos independientes.

\* Concentración en la cual la fagocitosis se inhibe en un 50%.

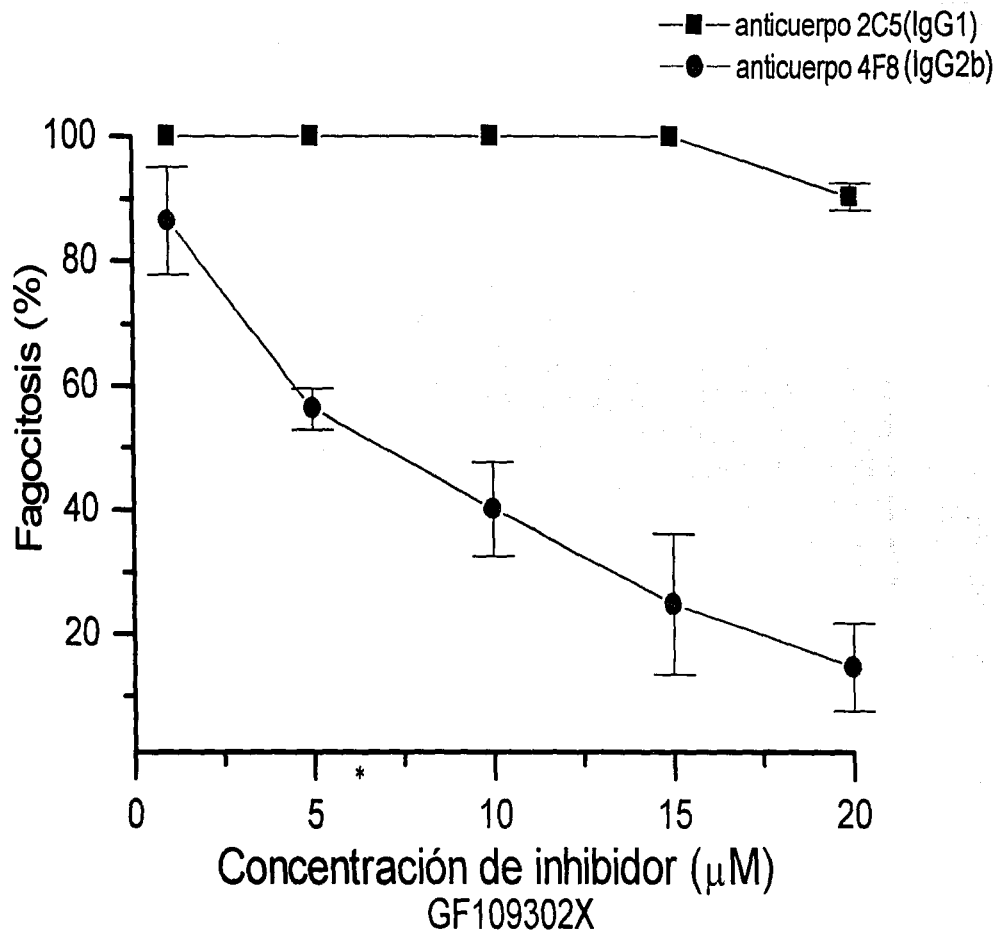


Fig. 15. Efecto del inhibidor GF109203X sobre la fagocitosis mediada por  $Fc\gamma R$ . Células J774 se trataron con distintas concentraciones del inhibidor GF109203X: 1, 3, 5, 10, 15 y 20  $\mu M$  por 30 minutos, o bien sólo con el disolvente dimetilsulfóxido (DMSO), antes de mezclarlas con eritrocitos sensibilizados u opsonizados con los anticuerpos 4F8 y 2C5 a una concentración hemaglutinante (1.875  $\mu g/ml$ ). Las células J774 y los eritrocitos se incubaron por 50 minutos a 37° C. Los datos se expresan como el porcentaje del valor máximo de fagocitosis obtenido con cada uno de los anticuerpos, en ausencia del inhibidor, pero en presencia del vehículo. Los datos son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 4 experimentos independientes.

\* Concentración en la cual la fagocitosis se inhibe en un 50%.

20  $\mu\text{M}$  se inhibió totalmente la fagocitosis inducida por ambos anticuerpos (Fig. 14). La  $\text{IC}_{50}$  de la fagocitosis inducida por ambos anticuerpos fue de 10  $\mu\text{M}$ .

**La fagocitosis inducida por el anticuerpo 2C5 depende de la actividad de las isoformas nuevas de las enzimas de la familia PKC.** Cuando las células fueron tratadas con el inhibidor GF109203X , la fagocitosis inducida por cada anticuerpo se inhibió de modo diferente (Fig. 15). La fagocitosis inducida por el anticuerpo 2C5 se inhibió sólo en un 10% a la concentración de 20  $\mu\text{M}$ ; se sabe que esa concentración inhibe las isoformas nuevas de PKC, mientras que la fagocitosis inducida por el anticuerpo 4F8 se inhibió de manera dosis dependiente; alcanzando un 90% de inhibición a la concentración mayor (Fig. 15). El 50% de inhibición para la fagocitosis inducida por el anticuerpo 4F8 se observó a concentraciones de 7.5  $\mu\text{M}$ , concentración a la que se espera sólo sean afectadas las isoformas clásicas de PKC. El efecto sobre la fagocitosis de las eritrocitos opsonizados con el anticuerpo 4F8 aumentó hasta alcanzar el máximo de inhibición, a las concentraciones del inhibidor que afectan a las isoformas nuevas de PKC.



## VIII. DISCUSIÓN

Las primeras defensas del organismo contra la infección por agentes patógenos, son componentes del sistema inmune innato que comprende barreras físicas, moléculas del complemento y la actividad de fagocitos "profesionales". Los macrófagos son elementos esenciales del sistema inmunológico, no solo por ser parte de las primeras líneas de defensa del organismo, si no porque están involucrados en la activación y regulación de mecanismos específicos de la respuesta inmune, al desempeñarse como células presentadoras de antígeno y secretoras de mediadores proinflamatorios y de citocinas inmunorreguladoras.

La eficiente actividad fagocítica de los macrófagos está relacionada con la expresión de receptores especializados, entre ellos los Fc $\gamma$ R. Estos receptores unen la porción Fc de las IgG. Los distintos tipos de Fc $\gamma$ R unen con alta o baja afinidad a su ligando. El Fc $\gamma$ RI es el receptor de alta afinidad para IgG, la une monoméricamente y presenta una afinidad relativa por las distintas subclases de IgG humanas en la siguiente relación: IgG3  $\approx$  IgG1 > IgG4 > IgG2 (revisado en Santana, 1996). Para los receptores de baja afinidad, el Fc $\gamma$ RII y el Fc $\gamma$ RIII, se han reportado patrones similares; sin embargo, existen datos contradictorios al respecto (revisado en Garay, 2002). En el sistema murino se reportó que el Fc $\gamma$ RI une a la subclase IgG2a de manera monomérica al igual que el Fc $\gamma$ RII une a la subclase IgG2b; mientras que, el Fc $\gamma$ RIII es específico para la IgG3 polimérica (Lund, 1992).

En los primeros eventos de la fagocitosis, los Fc $\gamma$ R son agregados en la zona de reconocimiento, esto induce el reclutamiento de enzimas citoplásmicas a la vecinda<sup>d</sup>

del agregado (revisado en Daëron, 1997). Actualmente, se acepta como un hecho que la agregación de los Fc $\gamma$ R conduzca a la activación celular. Sin embargo, al estudiar la función del TCR, el BCR y el Fc $\epsilon$ RI, que son receptores con características estructurales y mecanismos bioquímicos de activación similares a los Fc $\gamma$ R, algunos resultados experimentales apoyan la idea de que el tipo de respuesta; es decir, sus características e intensidad, no sólo dependen de la agregación sino de las propiedades estructurales del agregado (Manger, 1987; Ortega, 1988; Brunswick, 1989; Ortega, 1989; Pecht, 1991; Jeddi-Tehrani, 1992; Pleiman, 1994; Ortega, 1999).

Para estudiar la respuesta generada por el entrecruzamiento de los Fc $\gamma$ R se generaron anticuerpos monoclonales anti-DNP de distintas subclases, entre ellos los anticuerpos 2C5 y 4F8, que son respectivamente IgG1 e IgG2b. Estos anticuerpos mediaron con distinta eficiencia la fagocitosis de eritrocitos opsonizados. Al analizar la unión entre la inmunoglobulina y el hapteno, las diferencias que se encontraron no pudieron explicar este fenómeno (Garay, 1994). Aún cuando algunos reportes indican que existen diferencias en la afinidad relativa de los Fc $\gamma$ R por las distintas subclases de IgG (revisado en Santana, 1996); existen reportes que indican que las IgG1 e IgG2b poliméricas se unen específicamente al Fc $\gamma$ RII (Walker, 1976; Heusser, 1977; Diamond, 1980; Weinshank 1988); además de que al analizar la interacción efectiva entre el eritrocito opsonizado con las distintas subclases (IgG) y con el receptor de la célula fagocítica (receptor de IgG), ni en nuestro trabajo (datos no mostrados) ni en trabajos previos (Garay, 1994), se observaron diferencias de asociación entre las distintas subclases de IgG usadas y las células. Estos resultados indican que los anticuerpos

presentan la misma eficiencia para mediar la unión de la partícula a la célula a través de los FcγR.

Los anticuerpos 2C5 y 4F8 pertenecen a distintas subclases de IgG. Una de las principales diferencias entre las subclases de IgG radican en la estructura de la zona de la bisagra, como lo sugieren estudios hechos en poblaciones de anticuerpos monoclonales (Dudich, 1978). Trabajos previos indican que las principales diferencias entre anticuerpos monoclonales de las subclases IgG1 e IgG2b generados en ratones BALB/c, que es la misma cepa de ratón donde se generaron los anticuerpos 4F8 y 2C5, radican en la porción amino terminal de la zona bisagra: en la IgG1 este segmento está formado por 6 residuos, mientras que la IgG2b por 14 residuos (Parham, 1983). Se ha propuesto que las características de la zona bisagra determinan la estructura y función global del anticuerpo y definen la flexibilidad de la molécula. Estudios sobre la flexibilidad entre los distintos segmentos de inmunoglobulinas intactas determinaron que la flexibilidad es mayor en la subclase IgG2b y mucho menor para la subclase IgG1 y, funcionalmente, se encontró que esto correlacionaba con la capacidad de estas subclases para mediar la activación del complemento (Chan, 1977; Oi, 1984; Kim, 1994). Además, al determinar la estructura tridimensional de inmunoglobulinas de la misma subclase se definió que ambas muestran claras diferencias en cuanto al estado conformacional que pueden adoptar y al grado de flexibilidad de la molécula en relación a las características estructurales de la región bisagra (Harris, 1998). Aledaño a la zona bisagra se encuentra el dominio C<sub>H</sub>2 de la porción Fc, se sabe que este dominio es el que interacciona con el receptor (Kato, 2000). Estos datos nos sugirieron que la flexibilidad de la zona bisagra podría determinar la forma en que el anticuerpo

interacciona con el receptor y con ello influir sobre las propiedades estructurales y/o de estabilidad de los agregados del receptor.

Una opción para explicar las diferencias en la eficiencia para mediar la fagocitosis, entre los anticuerpos 2C5 y 4F8, es que las diferencias se deban a que los agregados de Fc $\gamma$ R que forman las partículas opsonizadas con estos anticuerpos tengan diferencias estructurales (diferencias de conformación del agregado y/o de orientación de las subunidades de los receptores entre sí, así como de estabilidad del agregado), y que estas se reflejen cualitativa y cuantitativamente en la activación de las enzimas involucradas en la fagocitosis.

Para probar nuestra hipótesis analizamos el papel de distintas enzimas durante la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con los distintos anticuerpos. Se sabe que con el entrecruzamiento de los Fc $\gamma$ R se activan muchas enzimas. La señal inicia con la activación de cinasas de la familia Src (Hamada, 1993; Piganata, 1993; Germano, 1994; Ghazizadeh, 1994; Durden, 1995) y continúa a través de cinasas de la familia Syk/ZAP-70 (Fukamachi, 1993; Durden, 1994; Ghazizadeh, 1995; Zeitlmann, 1998), para después amplificarse y divergir a través de la activación de otras enzimas que tienen como sustratos proteínas o lípidos. El esquema de las interacciones entre estas enzimas durante la fagocitosis no está completo; sin embargo, se ha logrado definir que la participación de las enzimas PLD, ERK, PI 3-K y PKC es necesaria para llevar a cabo la fagocitosis (Suchard, 1997; Suchard, 1997a; Lennartz, 1999).

El estudio de la participación de enzimas, en la respuesta celular a un estímulo específico puede abordarse de dos maneras complementarias entre sí: una es midiendo la actividad de la enzima después del estímulo y, la otra, es inhibirla antes del

estímulo (esto puede realizarse usando inhibidores específicos o transfectando a la célula con dominantes negativos). Las dos estrategias tienen defectos: en la primera no se sabe si la activación es esencial para la respuesta, y en la segunda no se sabe si el efecto es directo o indirecto. Como un acercamiento inicial para investigar mecanismos bioquímicos involucrados en las diferencias en la fagocitosis inducida por las distintas subclases, en este trabajo iniciamos estudiando el efecto de inhibidores enzimáticos.

Existen reportes de que la enzima PLD es activada durante la endocitosis de complejos inmunes. Su actividad se requiere para mantener niveles óptimos de fagocitosis y para que se lleve a cabo el tráfico vesicular (Gewirtz, 1997; Suchard, 1997; Meléndez, 1998; Kusner, 1999). Sin embargo, su activación no es necesaria para los arreglos del citoesqueleto necesarios para la fagocitosis (Lennartz, 1999). Por ello, decidimos inhibir la actividad de esta enzima durante la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con cada anticuerpo. Para cumplir este fin empleamos al compuesto curcumina que con las concentraciones empleadas, demostró afectar en ensayos *in vitro* 80% la actividad de PLD y 50% la actividad de PLA<sub>2</sub> (Yamamoto, 1997). Aunque la actividad de PLA<sub>2</sub> se requiere primordialmente durante la producción de mediadores de la inflamación (Sammuelsson, 1978), algunos reportes indican que su actividad facilita la fusión de membranas (Lennartz, 1997). Al inhibir a estas dos enzimas bloqueamos la vía que conduce a la fusión de vesículas con la membrana plasmática pero no bloqueamos la vía que conduce a la activación de PKC.

La inhibición de esta vía por curcumina parece no tener efecto sobre la fagocitosis inducida por ambas subclases. Nuestros resultados mostraron una disminución de sólo el 20% de la fagocitosis; reflejando que la vía de señalización que

conduce a la fusión de membranas necesaria para la fagocitosis en macrófagos no depende únicamente de la actividad de PLD y PLA<sub>2</sub>. Hay datos que apoyan el hecho que macrófagos humanos requieren la actividad de PLD durante la fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG (Kusner, 1999); sin embargo, se ha reportado que durante la diferenciación de la línea monocítica hay un interruptor molecular que define la activación preferencial de una enzima sobre otra (Meléndez, 1999). Al parecer, la vía que activa a PLD la utilizan los monocitos; mientras que los macrófagos usan preferentemente a PI 3-K durante la fagocitosis (García, 2001).

Aunque hay discrepancias sobre el papel de PLD durante la fagocitosis, la importancia de PI 3-K durante la fagocitosis mediada por los FcγR es clara (Nonomiya, 1994; Indik, 1995; Araki, 1996; Crowley, 1997; Toker, 1997). La activación de esta enzima se refleja en varios eventos necesarios para la fagocitosis como son: la extensión de los pseudópodos (Lennartz, 1999; Cox, 1999), y la remodelación del citoesqueleto (Toker, 1997). Aunque es otra manera de analizar la vía que conduce a la fusión de vesículas durante la fagocitosis, sabemos que al inhibir a esta enzima también hay consecuencias sobre el rearrreglo del citoesqueleto. Para inhibirla, empleamos al compuesto LY294002, que en ensayos *in vitro* demostró inhibir completamente la actividad de la PI 3-K (Vlahos, 1994).

Nuestros datos demuestran que la fagocitosis inducida por las dos subclases presenta distinto grado de dependencia por la actividad de PI 3-K. Nosotros determinamos que la fagocitosis inducida por partículas opsonizadas con el anticuerpo 4F8 depende, en gran medida, de la actividad de PI 3-K, pero no ocurre de la misma manera para la fagocitosis inducida por el anticuerpo 2C5. Una explicación al efecto de

LY94002 es que la fagocitosis inducida por la subclase IgG1 active menos eficientemente a esta enzima y esta podría ser la razón de que este anticuerpo induzca una pobre fagocitosis en contraste con la fagocitosis inducida por la subclase IgG2b; lo que concuerda con múltiples reportes que indican que PI 3-K está involucrada en varios puntos críticos de la fagocitosis (Toker, 1997; Indik, 1995; Nonomiya, 1994; Crowlwy, 1997; Araki, 1996). El distinto grado de dependencia por la actividad de PI-3K entre ambas respuestas fagocíticas podrían encontrar explicación en la propuesta de que los agregados del receptor formados por cada subclase activan de distinta manera a PI 3-K. Esta relación ha sido demostrada en otro sistema; se ha probado que diferencias en la estimulación del Fc $\epsilon$ RI generan señales que, con distinta eficiencia, activan a la célula lo cual se asocia a la activación y/o regulación diferencial de Lyn, una cinasa de tirosina (Ortega, 1999).

La actividad de PI 3-K no sólo se requiere durante el cierre del fagosoma, además es necesaria durante la formación de filamentos de actina a través de la activación de proteínas G pequeñas y muchos de sus productos regulan la actividad de moléculas involucradas en la señalización intracelular que conduce a la fagocitosis, como ocurre en el caso de las isoformas de PKC independientes de calcio (Kapeller, 1994; Araki, 1996; Reif, 1996; Lennartz, 1997; Toker, 1997). Con estos antecedentes, otra explicación posible al efecto de LY294002 es que exista un punto de regulación sobre las enzimas fagocíticas activadas por PI 3-K que sean activadas de manera independiente a PI 3-K; por lo que la inhibición de esta enzima no se refleja de la misma manera sobre la fagocitosis. Concordando con lo anterior, existen reportes de que sobre una sola enzima convergen varias vías de señalización inducidas por el

mismo estímulo, como ocurre durante la activación de Raf-1 por Ras o por PKC $\delta$  (Olson, 2000; Mansfield, 2000).

La activación de la vía de MAPK siempre se relacionó con actividad transcripcional, sin embargo hay evidencias que sugieren que este no es su único papel al activar a la célula. La vía de MAPK se activa con el entrecruzamiento de los Fc $\gamma$ R (Rose, 1997; Durden, 1995). Parte de esta vía conduce a la activación de ERK1 y ERK2. Se sabe que la actividad de estas enzimas se requiere para internalizar partículas opsonizadas con IgG (Suchard, 1997; McLeish, 1998; Reader, 1999) y se ha podido determinar que ERK2 está involucrada en el rearrreglo del citoesqueleto (Mansfield, 2000). Para inhibir a estas enzimas utilizamos al compuesto PD98059 que inhibe la activación de MEK, el paso previo en la vía de activación de ERK. Nuestros datos muestran que la inhibición de estas enzimas por PD98059 afectó de manera dosis-dependiente la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con ambas subclases, demostrando que la actividad de estas enzimas se requiere para que se lleve a cabo la fagocitosis.

Hay reportes de que durante la internalización de partículas opsonizadas con IgG se requiere la actividad de ERK2 para activar a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) (Mansfield, 2000). Nuestros resultados sugieren que la actividad de ERK1 también juega un papel importante durante la internalización de la partícula. Esto se concluye a partir del hecho de que PD98059 inhibe, de manera diferente, a ERK1/ERK2, siendo diez veces menos eficiente en prevenir la activación de MEK2 (Cohen, 1997). A las concentraciones que sólo afectan la actividad ERK1 se observa inhibición de la fagocitosis. El que no existan diferencias en la inhibición de la



fagocitosis de los eritrocitos opsonizadas con los dos anticuerpos por PD98059 nos sugiere que MEK, y por ende ERK, es activada de la misma manera por los dos estímulos fagocíticos.

Se sabe que otra de las vías importantes para el proceso fagocítico es la que conduce a la activación de las enzimas PKC. Se ha demostrado que la membrana fagosomal se enriquece con las isoformas PKC $\alpha$ , PKC $\delta$  y PKC $\epsilon$  (Zheng, 1995; Allen, 1996; Breton, 2000), que forman parte de la maquinaria fagocítica. Acorde con estos reportes nuestros resultados muestran que la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con ambas subclases requiere de la actividad de PKC. Sin embargo, los dos estímulos fagocíticos presentan distintos requerimientos por las isoformas de PKC. Nuestros resultados demuestran que la fagocitosis inducida por el anticuerpo 4F8 requiere primordialmente de la actividad de las isoformas clásicas, es decir aquellas isoformas dependientes de DAG y calcio, como PKC $\alpha$ . Esto no ocurre en la respuesta inducida por el anticuerpo 2C5, donde no se observó efecto alguno sobre la fagocitosis cuando las células fueron tratadas con las concentraciones del inhibidor GF109203X que solo inhiben la actividad de las isoformas clásicas, pero cuando las concentraciones afectaron la actividad de las isoformas nuevas, como son PKC $\delta$  y PKC $\epsilon$ , se observó una disminución de la fagocitosis. Esto concuerda con la independencia entre la respuesta de calcio y el proceso fagocítico, y con la trascendencia de estas isoformas durante el rearrreglo del citoesqueleto que realizan a través de regular la actividad de las proteínas MARK que se asocia a la depolimerización de actina necesaria en los últimos eventos para la internalización del fagosoma (Kwiatkowska, 1999).

Nuestros datos sugieren que las diferencias en la eficiencia de la fagocitosis se deben a que los distintos agregados formados por las partículas opsonizadas con estas inmunoglobulinas involucran de distinta manera a las enzimas celulares que participan en la fagocitosis. En este sentido, los dos estímulos activan a la vía de PLD/PLA<sub>2</sub> y a la vía de MAPK de la misma manera; no así a PI 3-K y a PKC. Tanto la actividad de PI 3-K como de algunas isoformas de PKC representan pasos en la regulación de la fagocitosis que permite hacer mas eficiente al proceso durante la diferenciación de la línea monocítica (García, 2001).

Estos resultados sugieren que la pobre fagocitosis mediada por la subclase IgG1 se debe a que este estímulo fagocítico no es capaz de activar eficientemente a PI 3-K y a las formas clásicas de PKC. Esto concuerda con reportes previos que indican que la mayor capacidad fagocítica de los macrófagos en relación a los monocitos, se debe a que durante su diferenciación los macrófagos adquieren la capacidad de reclutar tanto a PI 3-K como a PKC a la maquinaria enzimática involucrada en la fagocitosis.

Las diferencias observadas en la fagocitosis mediada por ambos anticuerpos podrían estar relacionadas con diferencias en características de los agregados, las cuales pueden estar influidas por la estructura de la región bisagra de cada anticuerpo.

La idea de que diferencias en la forma de agregar a los receptores pueden conducir a la activación diferencial de la maquinaria enzimática, no es nueva (Ortega, 1995); sin embargo, nuestros resultados muestran por primera vez que esta relación se da durante la activación de los FcγR.

Cuáles son las diferencias bioquímicas en las vías de señalización activadas por los estímulos fagocíticos dados por el anticuerpo 4F8 y 2C5 que conducen a la

activación diferencial de estas enzimas, no lo sabemos. Lo que si sabemos es que estos anticuerpos son distintos e inducen distintas respuestas celulares que se asocian con diferencias cualitativas y cuantitativas en la activación de las enzimas involucradas en la fagocitosis.

## IX. CONCLUSIONES

Nuestros resultados confirman que hay una diferencia significativa en la capacidad de mediar fagocitosis de partículas opsonizadas entre las subclases de IgG1 e IgG2b murinas

En la fagocitosis mediada por ambas subclases hay diferencias en la participación de distintas enzimas en cada caso.

Los dos estímulos fagocíticos dependen de la misma manera de la actividad de las vías PLD/PLA<sub>2</sub> y MAPK. Sin embargo, la participación de la vía de MAPK es mas trascendente para que se lleve a cabo la fagocitosis que la participación de la vía de PLD/PLA<sub>2</sub>.

Las principales diferencias se observaron en la participación de PI 3-K y PKC. La fagocitosis inducida por partículas opsonizadas con el anticuerpo 4F8 (IgG2b) depende en gran medida de la actividad de PI 3-K, pero esta dependencia es menor para la fagocitosis inducida por el anticuerpo 2C5 (IgG1). Por otra parte, la fagocitosis inducida por el anticuerpo 4F8 requiere primordialmente de la actividad de las isoformas clásicas de PKC, mientras que la fagocitosis inducida por el anticuerpo 2C5 requiere de la actividad de las isoformas nuevas de PKC.

## IX. LITERATURA CITADA

- Aderem A, Underhill DM. 1999. Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 593-623
- Ahn NG, Campbell JS, Seger R, Jensen AM, Graves LM, Krebs EG. 1993. Metabolic labelling of MAP kinase kinase in A431 cells demonstrates phosphorylation on serine and treonine residues. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 90: 5143-5147
- Adetugbo K. 1978. Evolution of immunoglobulin subclasses. Primary structure of a murine myeloma gamma1 chain. *J Biol Chem.* 253:6076
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. 3a. Edicion. Garland Publishing, Inc. New York
- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. 1995. PD 98059 Is a Specific Inhibitor of the Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase *in Vitro* and *in Vivo*. *J. Biol.Chem.* 270: 27489
- Allen L-AH, Aderem A. 1995. A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *J. Exp. Med.* 182: 829
- Allen L-AH, Aderem A. 1996. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.* 184: 627
- Ammon HP, Wahl MA. 1991. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med.* 57: 1
- Araki N, Johnson MT, Swanson JA. 1996. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J. Cell Biol.* 135: 1249
- Auger MJ, Ross JA. 1992. The biology of the macrophage. En *The Macrophage*, Editada por Lewis CE, Y McGee J.O'D. Ed. IRL Press. USA.
- Berken A, Benacerref B. 1966. Properties of antibodies cytophilic for macrophages. *J. Exp. Med.* 123: 119
- Bit RA, Davies PD, Elliot LH, Harris W, Hill CH, Keech E, Kumar MKH, Lawton G, Maw A, Nixon JS, Vesey DR, Wadsworth J, Wilkinson SE. 1993. Inhibitors of protein

kinase C. 3. Potent and highly selective bisindolylmaleimides by conformational restriction. *J. Med. Chem.* 36: 21

Brack M, Coffey PJ, Lammers J-WL, Koenderman L. 1998. Analysis of signal transduction pathways regulating cytokine-mediated Fc Receptor activation on human Eosinophils. *J. Immunol.* 161: 6768

Breton A, Descoteaux A. 2000. Protein Kinase C- $\alpha$  participates in Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 276: 472

Brown EJ. 1995. Phagocytosis. *Bioessays* 17: 109

Brunswick M, June CH, Finkelman FD, Mond JJ. 1989. Different patterns of inositol polyphosphate production are seen in B lymphocytes after cross-linking of sIg by anti-Ig antibody or by a multivalent anti-Ig antibody dextran conjugate. *J. Immunol.* 143: 1414

Budworth J, Gescher A. 1995. Differential inhibition of cytosolic and membrane-derived protein kinase C activity by staurosporine and other kinase inhibitors. *FEBS Letters* 362: 139

Carayannopoulos L, Capra JD. 1993. Immunoglobulins: structure and function. *En Fundamental Immunology*. Edited por W. Paul. Raven Press. New York.

Chan LM, Cathou RE. 1977. The role of the inter-heavy chain disulfide bond in modulating the flexibility of immunoglobulin G antibody. *J. Mol. Biol.* 112: 653

Chen B-C, Chou C-F, Lin W-W. 1998. Pyrimidinoceptor-mediated potentiation of inducible nitric-oxide synthase induction in J774 macrophages. *J. Biol. Chem.* 273 (45): 29754-29763

Cissel D, Fraundorfer P, Beaven M. 1999. Phospholipase D and its role in mast cell. *En Signal Transduction in Mast Cells and Basophils*, Edited Razin E, Rivera J. Ed. Springer. New York

Cohen P. 1997. The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends Cell Biol.* 7:353

Colley WC, Sung T-C, Roll R. 1997. Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr. Biol.* 7: 191

Colucci F, Turner M, Schweighoffer E, Guy-Grand D, Di Bartolo V, Salcedo M, Tybulewicz VL, Di santo JP. 1999. Redundant role of the Syk protein tyrosine kinase in mouse NK cell differentiation. *J. Immunol.* 163: 1769

Cowen DS, Sowers RS, Manning DR. 1996. Activation of a Mitogen-activated protein kinase (ERK2) by the 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor is sensitive not only to inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase but to an inhibitor of phosphatidylcholine hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 271(37): 22297

Cox D, Tseng C-C, Gordana B, Greenberg S. 1999. A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J. Biol. Chem.* 274(3): 1240

Coxon PY, Rane MJ, Pwell DW, Klein JB, McLeish Kenneth R. 2000. Differential Mitogen-Activated Protein Kinase Stimulation by Fc $\gamma$  Receptor IIa and Fc $\gamma$  Receptor IIIb determines the activation phenotype of human neutrophils. *J. Immunol.* 164: 6530

Crowley MT, Costello PS, Fitzner-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, Tybulewicz SLJ, De Franco AL. 1997. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis by Fc $\gamma$  receptors on macrophages. *J. Exp. Med.* 186: 1027

Daéron M. 1997. Fc Receptor Biology. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203

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

Darby C, Geahlen RL, Schreiber AD, 1994. Stimulation of macrophage Fc $\gamma$ RIIIA 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

Davis PD, Hill CH, Keech E, Lawton G, Nixon JS, Sedgwick AD, Wadsworth J, Westmacott D, Wilkinson SE. 1989. Potent selective inhibitors of protein kinase C. *FEBS Letters* 259: 61

Deo YM, Graziano RF, Repp R, van de Winkel JG. 1997. Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc gamma R-directed immunotherapies. *Immunol Today* 18:127

Dhand R, Hiles I, Panayotou G, Roche S, Fry MJ, Gout I, Totty NF, Truong O, Vicendo P, Yonezawa K. 1994. PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *EMBO J.* 13: 522

- Diamond B, Scharff MD. 1980. IgG1 and IgG2b share the Fc receptor on mouse macrophages. *J Immunol* 125:631
- Didichenko SA, Tilton B, Hemmings BA, Ballmer-Hofer K, Thelen M, 1996. Constitutive activation of protein kinase B and phosphorylation of p47phox by a membrane-targeted phosphoinositide 3-kinase. *Curr. Biol.* 6:1271
- Dieter P, Fitzke E. 1991. Ro 31-8220 and Ro 31-7549 show improved selectivity for protein kinase C over Staurosporine in macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 181: 396
- Domin J, Waterfield MD. 1997. Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members. *FEBS Letters* 410: 91
- Dudich E, Nezlin RS, Franek F. 1978. Fluorescence polarization analysis of various immunoglobulins. Dependence of rotational relaxation time on protein concentration and on ability to precipitate with antigen. *FEBS Lett.* 89: 89
- Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. 1995. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 7686
- Durden DL, Liu YB, 1994. Protein-tyrosine kinase p72syk in Fc $\gamma$ RI receptor signaling. *Blood* 84: 2102
- Durden DL, Kim HM, Calore B, Liu Y. 1995. The Fc $\gamma$ RI receptor signals through the activation of hck and MAP kinase. *J. Immunol.* 154: 4039
- Eason S. & Martin W. 1995. Involvement of Tyrosine Kinase and Protein Kinase C in the induction of nitric oxide synthase by Lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$  in J774 macrophages. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 330: 225
- Eder AM, Dominguez L, Franke TF, Ashwell JD. 1998. Phosphoinositide 3-kinase regulation of T Cell Receptor-mediated interleukin-2 gene expression in normal T cells. *J. Biol. Chem.* 273(43): 28025
- Einspahr KJ, Abraham RT, Bindstadt BA, Uehara Y, Liebson PJ. 1991. Tyrosine Phosphorylation Provides an Early and Requisite Signal for the Activation of Natural Killer Cell Cytotoxic Function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6279
- Ella K, Meier KE, Kumar A, Zhang Y, Meier GP. 1997. Utilization of alcohols by plant and mammalian phospholipase D. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 41:715



English D. 1996. Phosphatidic acid: a lipid messenger involved in intracellular and extracellular signalling. *Cell Signal.* 8: 341

Fallman M, Gullberg M, Hellberg C, Anderson T. 1992. Complement receptor-mediated phagocytosis is associated with accumulation of phosphatidylcholine-derived diglyceride in human neutrophils. Involved of phospholipase D and direct evidence for a positive feedback signal of protein kinase. *J. Biol. Chem.* 267: 2656

Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. 1990. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J. Immunol. Methods* 131: 165

Flanagan CA, Schnieders EA, Emerick AW, Kunisawa R, Admon A, Thorner J. 1993. Phosphatidylinositol 4-kinase: gene structure and requirement for yeast cell viability. *Science* 262 (5138): 1444

Fukamachi H, Takei M, Kawakami T. 1993. Activation of multiple protein kinases including a MAP Kinase upon Fc $\epsilon$ RI cross-linking. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 102: 15

Furlong MT, Mahrenholz, AM, Kim Ki-Han, Ashendel CL, Harrison ML. 1997. Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk. *Biochim. Biophys. Acta* 1355: 177

Garay CA. 1994. Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales murinos de la clase IgG, específicos para el 2,4-dinitrofenol. Tesis Licenciatura. Facultad Química. UNAM. México.

Garay CA. 2002. Influencia de la subclase de IgG para mediar fagocitosis en macrófagos murinos. Tesis Maestría. Facultad Química. UNAM. México.

García E. 2001. Transducción de señales durante la fagocitosis mediada por receptores Fc $\gamma$ . Tesis Licenciatura. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. México

Germano P, Gomez J, Kazanietz MG, Blumberg PM, Rivera J. 1994. Phosphorylation of the gamma chain of the high affinity receptor for immunoglobulin E by receptor-associated protein kinase C-delta. *J. Biol. Chem.* 269: 23102

Gewirtz AT, Simons ER. 1997. Phospholipase D mediates Fc gamma receptor activation of neutrophils and provides specificity between high-valency immune complexes and fMLP signaling pathways. *J. Leukoc. Biol.* 61: 522

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

Ghazizadeh S, Bolen JB, Fleit HB. 1995. Tyrosine phosphorylation and association of Syk with Fc $\gamma$ RII in monocytic THP-1 cells. *Biochem J.* 305: 669

GIBCO BRL. 1992. Catalogue and reference Guide, 11, 82.

Gillooly D, Melendez AJ, Hockaday AR, Harnett MM, Ellen JM. 1999. Endocytosis and vesicular trafficking of immune complexes and activation of phospholipase D by the human high-affinity IgG receptor requires distinct phosphoinositide 3-kinase activities. *Biochem J.* 344: 605

Grammer TC, Blenis J. 1997. Evidence of MEK-independent pathways regulating the prolonged activation of the ERK-MAP kinases. *Oncogene* 14: 1635

Gratacap M-P, Payrastra B, Viala C, Mauco G, Plantavid M, Chap H. 1998. Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent stimulation of phospholipase C- $\gamma$ 2 is an early key event in Fc $\gamma$ RIIA-mediated activation of human platelets. *J. Biol. Chem.* 273(38): 24314

Greenberg S, Burridge K, Silverstein SC. 1990. Colocalization of F-actin and talin during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J. Exp. Med.* 172: 1853

Greenberg S. 1995. Signal transduction of phagocytosis. *Trends Cell Biol.* 5: 93

Greenberg S y Silverstein SC. 1993. Phagocytosis. En *Fundamental Immunology*. Editada por W. Paul. Ed Raven. New York.

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* 90: 6305

Hamawy MM, Minoguchi K, Swaim WD, Mergenhagen SE, Siraganian RP. 1995. A 77-kDa protein associates with pp125FAK in mast cells and becomes tyrosine phosphorylated by high affinity IgE receptor aggregation. *J. Biol. Chem.* 270: 12305

Hammond SM, Altshuller YM, Sung T-C, Rudge SA, Rose K, Engebrecht J, Morris AJ, Frohman MA. 1995. Human ADP-ribosylation factor-activated

phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J. Biol. Chem.* 270: 29640

Hammond SM, John M. Jenco, Shigeru Nakashima, Karen Cadwallader, Qu-ming Gu, Simon Cook, Yoshinori Nozawa, Glenn D. Prestwich, Michael A. Frohman, and Andrew J. Morris. 1997. Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 272: 3860

Hansen MB, Nilsen SE, Berg K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods.* 119: 203

Harris LJ, Larson SB, Hasel KW, McPherson A. 1997. Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry* 36:1581

Harris LJ, Skaletsky E, McPherson A. 1998. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *J Mol Biol.* 275:861

Harlan JE, Hajduk PJ, Yoon HS, Fesik SW. 1994. Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 371: 168

Haysted TA, Dent P, Wu J, Haysted CM, Sturgill TW. 1992. Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase. *FEBS Lett.* 13: 17

Hemmings BA. 1997. PH domains-a universal membrane adaptor. *Science* 275: 1899

Heusser CH, Anderson CL, Grey HM. 1977. Receptors for IgG: subclass specificity of receptors on different mouse cell types and the definition of two distinct receptors on a macrophage cell line. *J Exp Med* 145:1316

House C, Kemp BE. 1987. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototype in its regulatory domain. *Science* 238: 1726

Huang MT, Smart RC, Wong CQ, Conney AH. 1988 Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* 48: 5941

Hunter T. 1995. When Is a Lipid Kinase Not a Lipid Kinase? When It Is a Protein Kinase. *Cell* 83: 1

Hurley JH, Newton AC, Parker PJ, Blumberg PM, Nishizuka Y. 1997. Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci.* 6: 477

Indik Z, Park JG, Hunter S, Schreiber AD. 1995. The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood* 86: 4389

Jaruga E., Sokal A., Chrul S., Bartosz G. 1998. Apoptosis-Independent alterations in membrane dynamics induced by curcumin. *Exp. Cell Res.* 245: 303

Jeddi-Tehrani M, Chow SC, Ansotegui IJ, Jondal M, Wigzell H. 1992. Potentiation of transmembrane signaling by cross-linking of antibodies against the beta chain of the T cell antigen receptor of Jurkat T cells. *Cell Immunol.* 141: 1

Jiang Y, Zhuangjie Li, Edward M. Schwarz, Anning Lin, Kunliang Guan, Richard J. Ulevitch, and Jiahuai Han 1997. Structure-function studies of p38 mitogen-activated protein kinase. Loop 12 influences substrate specificity and autophosphorylation, but not upstream kinase selection. *J. Biol. Chem.* 272: 11096

Joe B. & Lokesh BR. 1997. Effect of curcumin and capsaicin on Arachidonic acid metabolism and lysosomal enzyme secretion by rat peritoneal macrophages. *Lipids.* 32: 1173

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

Kaibuchi K, Fukumoto Y, Oku N, Takai Y, Arai KI, Maramatsu M. 1989. Molecular genetic analysis of the regulatory and catalytic domains of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 264: 13489

Kapeller R, Cantley LC. 1994. Phosphatidylinositol 3-kinase. *Bioessays* 16: 565

Kato K, Fridman WH, Arata Y, Sautés-Fridman C. 2000. A conformational change in the Fc precludes the binding of two Fcγ receptor molecules to one IgG. *Immunol Today.* 21: 310

Kawakami Y, Yao L, Miura T, Tsukada S, Witte ON, Kawakami T. 1994. Tyrosine phosphorylation and activation of Bruton tyrosine kinase upon FcεRI crosslinking. *Mol. Cell Biol.* 14: 5108

Kawakami Y, Yao L, Tashiro M, Gibson S, Mills GB, Kawakami T. 1995. Activation and Interaction with protein kinase C of a cytoplasmic tyrosine kinase, Itk-Tsk/Emt, on FcεRI cross-linking on mast cells. *J. Immunol.* 155: 3556

- Keegan AD, William EP. 1992. Multichain Immune Recognition Receptors: similarities structure and signaling pathways. *Immunol Today*. 13: 63
- Keller HU, Niggli V. 1993. The PKC-Inhibitor Ro 31-8220 selectively suppresses PMA-and Diacylglycerol-induced fluid pinocytosis and actin polymerization in PMNS. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 194: 1111
- Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi N, Latour S, Cheng A, Veillette A, Grinstein S, Pacuson T. 1998. The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc $\gamma$  receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol Cell. Biol.* 18: 4209
- Kiley S, Parker PJ. 1995. Differential localization of protein kinase C isozymes in U937 cells: evidence for distinct isozyme functions during monocyte differentiation. *J. Cell Sci.* 108: 1003
- Kim H, Matsunaga C, Yoshino A, Kato K, Arata Y. 1994. Dynamical structure of the hinge region of immunoglobulin G as studied by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 236: 300
- Kiss Z, Phillips H, Anderson WH. 1995. The bisindolylmaleimide GF 109203X, a selective inhibitor of protein kinase C, does not inhibit the potentiating effect of phorbol ester on ethanol-induced phospholipase C-mediated hydrolysis of phosphatidylethanolamine. *Biochem. Biophys. Acta.* 1265: 93
- Klarlund JK, Guilherme A, Holik JJ, Virbasius JV, Chawla A, Czech MP. 1997. Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains. *Science.* 275:1927
- Klein J, Hořejší V. 1997. *Immunology*. Ed. Blackwell Science. 722 p.
- Kodaki T, Yamashita S. 1997. Cloning, expression, and characterization of a novel phospholipase D complementary DNA from rat brain. *J. Biol. Chem.* 272: 11480
- Koichi K, Sautes -Fridman C, Wakako Y, Kobayashi K, Uchiyama S, Kim H, Enokizono J, galinha A, Kobayashi Y, Fridman WH, Arata Y, Shimada I. 2000. Structural basis of the Interaction between IgG and Fc $\gamma$  Receptors. *J. Mol. Biol.* 295: 213
- Kosawa O, Blume-Jensen P, Heldin CH, Ronnstrand L. 1997. Involvement of phosphatidylinositol 3'-kinase in stem-cell-factor-induced phospholipase D activation and arachidonic acid release. *Eur. J. Biochem.* 248: 149

- Kuo M-L., Huang T-S., Lin J-K. 1996. Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1317: 95
- Kusner DJ, Hall CF, Schlesinger LS. 1996. Activation of phospholipase D is tightly coupled to the phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* or opsonized zymosan by human macrophages. *J. Exp. Med.* 184: 585
- Kusner DJ, Hall CF, Jackson S. 1999. Fc $\gamma$  Receptor-mediated activation of Phospholipase D regulates macrophage phagocytosis of IgG-opsonized particles. *J. Immunol.* 162: 2266
- Kwiatkowska K, Sobota A. 1999. Signaling pathways in phagocytosis. *BioEssays* 21:422
- Law CL, Chandran KA, Sidorenko SP, Clark EA. 1996. Phospholipase C-gamma1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol. Cell. Biol.* 16: 1305
- Lay WH, Nussenzweig V. 1968. Receptors for complement on leucocytes. *J. Exp. Med.* 128: 991
- Lennartz MR, Brown EJ. 1991. Arachidonic acid is essential for IgG Fc receptor-mediated phagocytosis by human monocytes. *J. Immunol.* 147:621
- Lennartz MR, Yuen AFC, McKenzie-Masi S, Russell DG, Buttle KF, Smith JJ. 1997. Phospholipase A<sub>2</sub> inhibition results in sequestration of plasma membrane into electron lucent vesicles during IgG-mediated phagocytosis. *J. Cell. Sci.* 110: 2041
- Lennartz MR. 1999. Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid derived second messengers in phagocytosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31: 415
- Lewis CE, McGee JO'D. 1992. *The macrophage*. Oxford University Press
- Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. 1993. cPLA<sub>2</sub> is phosphorylated and activated by MAP kinases. *Cell* 72: 269
- Lin S, Cicala C, Scharenberg AM, Kinet JP. 1996. The Fc(epsilon)RI beta subunit functions as an amplifier of Fc(epsilon)RI gamma-mediated cell activation signals. *Cell.* 85: 985
- Louvin MH, Adamczewski M, Numerof R, Letourneur O, Vallé A, Kinet J-P. 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.* 269: 5918

Lund J, Pound JD, Jones PT, Duncan AR, Bentley T, Goodall M, Levine BA, Jefferis R, Winter G. 1992. Multiple binding sites on the CH2 domain of IgG for mouse Fc gamma R11. *Mol Immunol* 29:53

Manger B, Weiss A, Imboden J, Laing T, Stobo JD. 1987. The role of protein kinase C in transmembrane signalling by the T cell antigen receptor complex. Effects of stimulation with soluble or immobilized CD3 antibodies. *J. Immunol.* 139: 2755

Manifava M, Sugars J, Ktistakis NT. 1999. Modification of catalytically active Phospholipase D1 with fatty acid *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 274: 1072

Mansfield PJ, Shayman JA, Boxer LA. 2000. Regulation of polymorphonuclear leukocyte phagocytosis by myosin light chain kinase after activation of mitogen-activated protein kinase. *Blood.* 95: 2407

Marshall CJ. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signalling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell.* 80: 179

McLeish KR, Klein JB, Coxon PY, Head KZ, Ward RA. 1998. Bacterial phagocytosis activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen activated protein kinase cascades in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 64: 835

Melendez AJ, Floto RA, Gillooly DJ, Harnett MM, Allen JM. 1998. Fc $\gamma$ RI coupling to phospholipase D initiates sphingosine kinase-mediated calcium mobilization and vesicular traffic. *J. Biol. Chem.* 273: 9393

Melendez AJ, Gillooly DJ, Harnett MM, Allen JM. 1998a. Aggregation of the human high affinity immunoglobulin G receptor (Fc $\gamma$ RI) activates both tyrosine kinase and G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 2169

Melendez AJ, Harnett MM, Allen JM. 1999. Differentiation-dependent switch in protein kinase C isoenzyme activation by Fc $\gamma$ RI, the human high-affinity receptor for immunoglobulin G. *Immunology.* 96: 457

Metcalf D. 1971. Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies *in vivo*. *J. Cell Physiol.* 77: 277

Metchnikoff E. 1905. *Immunity in infective disease*. Cambridge University Press

Min DS, Park SK, Exton JH. 1998. Characterization of a rat brain Phospholipase D Isozyme. *J. Biol. Chem.* 273: 7044

Mitchell MA, Huang Mm, Chien P, Indik ZK, Pan XQ, Schreiber AD. 1994. Substitution and deletions in the cytoplasmic domain of the phagocytic receptor Fc gamma RIIA: effect on receptor tyrosine phosphorylation and phagocytosis. *Blood*. 84: 1753

Mochly-Rosen D. 1995. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science*. 268: 247

Moore MAS, Metcalf D. 1970. Ontogeny of the Haematopoietic system: yolk sac origin in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br. J. Haematol*. 18: 279

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 65: 55

Ninomiya N, Hazeki K, Fukui Y, Seya T, Okada T, Hasezi O, Ui M. 1994. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling. *J. Biol. Chem*. 269: 22732

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

Olson MF, Marais R. 2000. Ras protein signalling. *Sem. Immunol*. 12: 63

Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y. 1988. The structure, expression, and properties of additional members of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem*. 263:6927

Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y. 1989. Protein kinase C zeta subspecies from rat brain: its structure, expression, and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3099

Ortega E, Schweitzer- Stenner R, Pech I. 1988. Possible orientational constraints determine secretory signals induced by aggregation of IgE receptors on mast cells. *EMBO J*. 7: 4101

Ortega E, Schweitzer-Stenner R, Pech I. 1989. Receptor-effector coupling processes probed by monoclonal antibodies. *Prog. Clin. Biol. Res*. 289: 317



Ortega E, Hazan B, Zor U, Pech I. 1989a. Mast cell stimulation by monoclonal antibodies specific for the Fc epsilon receptor yields distinct responses of arachidonic acid and leukotriene C4 secretion. *Eur. J. Immunol.* 19: 251

Ortega E. 1995. How do multichain immune recognition receptors signal? A structural hypothesis. *Mol. Immunol.* 32: 941

Ortega E, Iara M, Lee I, Santana C, Martinez AM, Pfeiffer JR, Lee RJ, Wilson BS, Oliver JM. 1999. Lyn dissociation from phosphorylated Fc epsilon RI subunit: a new regulatory step in the Fc epsilon RI signaling cascade revealed by studies of Fc epsilon RI dimer signaling activity. *J. Immunol.* 162: 176

Panaretou C, Domin J, Cockcroft S, Waterfield MD. 1997. Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-Kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150-PtdIns 3-kinase complex. *J. Biol. Chem.* 272: 2477

Pang L, Sawada T, Decker SJ, Saltiel AR. 1995. Inhibition of MAP kinase kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 270: 13585

Parham P. 1983. On the fragmentation of monoclonal IgG1, IgG2a, and IgG2b from BALB/c mice. *J. Immunol.* 131: 2895

Park JG, Murray Rk, Chien P, Darby C, Schreiber Ad. 1993. Conserved cytoplasmic tyrosine residues of the gamma subunit are required for a phagocytic signal mediated by Fc gamma RIIIA. *J. Clin. Invest.* 92: 2073

Paul WE. 1993. *Fundamental Immunology*. 3a edición. Raven Press. New York

Pecht I, Ortega E, Jovin TM. 1991. Rotational dynamics of the Fc epsilon receptor on mast cells monitored by specific monoclonal antibodies and IgE. *Biochemistry.* 30: 3450

Penhallow RC, Class K, Sonoda H, Bolen JB, Rowley RB. 1995. Temporal activation of nontransmembrane protein-tyrosine kinases following mast cell FcεRI engagement. *J. Biol. Chem.* 270: 23362

Piganata C, Prasad KV, Robertson MJ, Levine H, Rudd CE, Ritz J. 1993. FcγRIIIA-mediated signal involves src-family lck in human natural killer cells. *J. Immunol.* 151: 6794

Pleiman CM, D' Ambrosio, Cambier JR. 1994. The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction. *Immunol Today*. 15: 393

Ponting CP, Kerr ID. 1996. A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein. Sci*. 5: 914

Pointing CP. 1996a. Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? *Protein. Sci*. 5: 2353

Qiu Z-H & Leslie CC. 1994. Protein Kinase C-dependent and -independent pathways of mitogen-activated protein kinase activation in macrophages by stimuli that activate phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem*. 269: 19480

Rabinovitch M. 1995. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol*. 5: 85

Raeder EM, Mansfield PJ, Hinkovska-Galcheva V, Shayman JA, Boxer LA. 1999. Syk activation initiates downstream signaling events during human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis. *J. Immunol*. 163: 6785

Raeder EM, Mansfield PJ, Hinkovska-Galcheva V, Kjeldsen L, Shayman JA, Boxer LA. 1999a. Sphingosine blocks human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis through inhibition of mitogen activated protein kinase activation. *Blood*. 93:1

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

Rameh LE, Chen S-S, Cantley LC. 1995. Phosphatidylinositol 3,4,5P<sub>3</sub> interacts with SH-2 domains and modulates PI-3 kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. *Cell*. 83: 821

Rameh LE, Rhee SG, Spokes K, Kazlauskas A, Cantley LC, Cantley LG. 1998. Phosphoinositide 3-kinase regulates Phospholipase C $\gamma$ -mediated calcium signaling. *J. Biol. Chem*. 273: 23750

Ravetch J, Kinoshita T. 1991. Fc receptors. *Ann. Rev. Immunol*. 9: 492

Reif K, Nobes CD, Thomas G, Hall A, Cantrell DA. 1996. Phosphatidylinositol 3-kinase signals activate a selective subset of Rac/Rho-dependent effector pathways. *Curr Biol*. 6: 1445

- Reth M. 1989. Antigen receptor tail clue. *Nature*. 338: 383
- Rhee Sg, Bae Ys. 1997. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymas. *J. Biol. Chem.* 272: 15045
- Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Downward J. 1996. Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO J.* 15: 2442
- Ron D, Luo J, Mochly-Rosen D. 1995. C2 Region-derived peptides inhibit translocation and function of  $\beta$  Protein Kinase C *in Vivo*. *J. Biol. Chem.* 270: 24180
- Rosales C, Brown EJ. 1993. Neutrophil collaboration in immune response. En *The Natural Immune System: The Neutrophil*. Editado por Wheeler JG y Abramson JS. Oxford University Press. New York.
- Rose DM, Winston BW, Chan ED, Riches CWH, Gerwins P, Johnson GL, Henson PM. 1997. Fc $\gamma$  receptor cross linking activates p42, p38, and JNK/SAPK mitogen-activated protein kinase in murine macrophages. Role for p42MAPK in Fc $\gamma$  receptor-stimulated TNF- $\alpha$  synthesis. *J. Immunol.* 158: 3433
- Sammuelsson B, Goldyne M, Granstrom E, Hamberg M, Hammarstrom S, Malmsten C. 1978. Prostaglandins and thromboxanes. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 977
- Sanchez-Mejorada G, Rosales C. 1998. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J. Leukoc. Biol.* 63: 521
- Sanchez-Mejorada G, Rosales C. 1998a. Fc $\gamma$  Receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in monocytes is independent of Ras. *J. Biol. Chem.* 273: 27610
- Santana C, Norris G, Espinoza B, Ortega E. 1996. Protein tyrosine phosphorylation in leukocyte activation through receptors for IgG. *J. Leukoc. Biol.* 60: 433
- Schu PV, Takegawa K, Fry MJ, Stack JH, Waterfield MD, Emr SD. 1993. Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science.* 260: 88
- Scott K, Oppenheim D, Oppenheim J. 1993. Proinflammatory cytokines and immunity. En *Fundamental Immunology*. Editado por W. Paul. Raven Press. New York.
- Seger R, Krebs E. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9: 726

- Serrander L, Fallman M, Stendahl O. 1996. Activation of phospholipase D is an early event in integrin-mediated signalling leading to phagocytosis in human neutrophils. *Inflammation*. 20: 439
- Shao X, Davletov BA, Sutton RB, Sudhof TC, Rizo J. 1996. Bipartite Ca<sup>2+</sup>-binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C. *Science*. 273: 248
- Sheterline P, Rickard JE, Boothroyd B, Richards RC. 1986. Phorbol ester induces rapid actin assembly in neutrophil leukocytes independently of changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and pHi. *J. Muscle Res. Cell Motil*. 7: 405
- Sillman AL, Monroe JG. 1995. Association of p72 Syk with the SRC homology -2 (SH2) domains of PLC- $\gamma$ 1 in B lymphocytes. *J. Biol. Chem*. 270: 11806
- Singh S. & Aggarwal B.B. 1995. Activation of transcriptional factor NF- $\kappa$ B is suppressed by curcumin (Difeulolylmethane). *J. Biol. Chem*. 270: 24995
- Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M. 1993. An improved MTT assay. *J. Immunol. Methods*. 157: 203
- Strzelecka A, Pyrzynska B, Kwiatkowska K, Sobota A. 1997. A Syk kinase tyrosine-phosphorylated proteins and actin filaments accumulate at forming phagosomes during Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis. *Cell Motil Cytoskeleton*. 38: 287
- Strzelecka A, Kwiatkowska K, Sobota A. 1997a. Tyrosine phosphorylation and Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis. *FEBS Letters*. 400: 11
- Su B, Karin M. 1996. Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr. Opin Immunol*. 8: 402
- Suchard SJ, Hinkovska-Galcheva V, Mansfield PJ, Boxer LA, Shayman JA. 1997. Ceramide inhibits IgG-dependent phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood*. 89: 2139
- Suchard SJ, Mansfield PJ, Boxer LA, Shayman JA. 1997a. Mitogen-activated protein kinase activation during IgG-dependent phagocytosis in human neutrophils: inhibition by ceramide. *J. Immunol*. 158: 4961
- Sung TC, Roper RL, Zhang Y, Rudge SA, Temel R, Hammond SM, Morris AJ, Moss B, Engebrecht J, Frohman MA. 1997. Mutagenesis of phospholipase D defines a

superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. EMBO J. 16: 4519

Sung TC, Zhang Y, Morris AJ, Frohman MA. 1999. Structural analysis of human phospholipase D1. J. Biol. Chem. 274: 3659

Sung TC, Altshuller YM, Morris AJ, Frohman MA. 1999a. Molecular analysis of mammalian phospholipase D2. J. Biol. Chem. 274: 494

Superti-Furga G, Courtneidge SA. 1995. Structure-function relationships in Src family and related protein tyrosine kinases. BioEssays. 17:321

Takai Y, Kishimoto A, Iwasa Y, Kawahara Y, Mori T, Nishizuka Y. 1979. Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. J. Biol. Chem. 254: 3692

Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F. 1986. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>++</sup> dependent protein kinase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 135: 397

Toker A, Cantley LC. 1997. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH Kinase. Nature 387: 673

Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, Duhamel L, Charon D, Kirilovsky J. 1991. The Bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of Protein Kinase C. J. Biol. Chem. 266: 15771

Trachsel S. & Kelller HU. 1995. Selective responses (actin polymerization, shape changes, locomotion, pinocytosis) to the PKC inhibitor Ro 31-8220 suggest that PKC discriminately regulates functions of human blood lymphocytes. J. Leuk. Biol. 57: 587

Turner M, Schweighoffer E, Colucci F, Di Santo J, Tybulewicz V. 2000. Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. Immunol. Today. 21: 148

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

Van Furth R, Cohn ZA. 1968. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. J. Exp. Med. 128: 415

Van Furth R, Diesselhoff-den D, Raeburn JA, van Zwet TL, Crofton R, van Oud AAB. 1980. Characteristics, origin and kinetics of human and murine mononuclear

phagocytes. En *Mononuclear phagocytes. Functional aspects*. Editada por R van Furth. Ed Martinus Nijhoff. London

Van Furth R, Sluiter W. 1986. Distribution of blood monocytes between a marginating and a circulating pool. *J. Exp. Med.* 163: 474

Van Furth R. 1989. Origin and turnover of monocytes and macrophages. *Curr. Top. Pathol.* 79: 125

Vanhaesebroeck B, Waterfield D. 1999. Signaling by distinct classes of Phosphoinositide 3-Kinases. *Exp Cell Res.* 253: 239

Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD. 2001. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 535

Vernhet L, Petit J-Y, Lang F. 1997. An anti-inflammatory benzamide derivative inhibits the Protein Kinase C (PKC)-dependent pathways of ERK2 phosphorylation in murine macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 283 (1): 358

Viera OV, Botelho RJ, Rameh L, Brachmann SM, Matsuo T, Davidson HW, Schreiber A, Backer JM, Cantley LC, Grinstein S. 2001. Distinct roles of class I and III phosphatidylinositol 3- kinases in phagosome formation and maturation. *J. Cell Biol.* 155: 19

Vilcek J. 1998. The cytokines: An Overview. En *The Cytokine Handbook*. Editado por Thomson A. Academic Press. London.

Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. 1994. A specific inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase, 2-(4Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269: 5241

Waksman M, Eli Y, Liscovitch M, Gerst JE. 1996. Identification and characterization of a gene encoding Phospholipase D activity in yeast. *J. Biol. Chem.* 271: 2361

Walker MR, Woof JM, Bruggemann M, Jefferis R, Burton DR. 1989. Interaction of human IgG chimeric antibodies with the human FcRI and FcRII receptors: requirements for antibody-mediated host cell-target cell interaction. *Mol Immunol* 26:403

Weinshank RL, Luster AD, Ravetch JV. 1988. Function and regulation of a murine macrophage-specific IgG Fc receptor, Fc gamma R-alpha. *J Exp Med* 167:1909

Wilkinson SE, Parker PJ, Nixon JS. 1993. Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *Biochem. J.* 294: 335

Wilson NJ, Jaworowski A, Ward AC, Hamilton JA. 1998. cAMP enhances CSF-1-induced ERK activity and c-fos mRNA expression via a MEK-dependent and Ras-independent mechanism in macrophages. *Bioch. Biophys. Res Comm.* 244: 475

Wymann M, Pirola L. 1998. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1436:127

Yamamoto H, Hanada K, Kawasaki K, Nishijima M. 1997. Inhibitory effect of curcumin on mammalian phospholipase D activity. *FEBS Letters.* 417: 196

Zeitlmann L, Knorr T, Knoll M, Romeo C, Sirim P, Kolanus W. 1998. T cell activation induced by novel gain-of-function mutants of Zyk and ZAP-70. *J. Biol. Chem.* 273: 15445

Zhang C, Beaven M. 1999. The MAP Kinases and their role in mast cell and basophils. En *Signal Transduction in Mast Cells and Basophils*. Editado Razin E, Rivera J. Ed. Springer. New York

Zheleznyak A, Brown E.J. 1992. Immunoglobulin-mediated phagocytosis by human monocytes requires Protein Kinase C activation. *J. Biol. Chem.* 267: 12042

Zheng L, Zomerdijk TPL, Aarnoudse C, van Furth R, Nibbering PH. 1995. Role of protein kinase C isozymes in Fc $\gamma$  receptor-mediated intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by human monocytes. *J. Immunol.* 155: 776

Zigmond SH, Hirsch JG, 1972. Effects cytochalasin B on polymorphonuclear leukocyte locomotion, phagocytosis and glycolysis. *Exp. Cell Res.* 73: 383