Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Licenciatura

Papel de los receptores para el fragmento Fc de la IgG en la modulación de la apoptosis de los granulocitos neutrofilos

Gamberale, Romina

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Gamberale, Romina. (). Papel de los receptores para el fragmento Fc de la IgG en la modulación de la apoptosis de los granulocitos neutrofilos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000566_Gamberale

Cita tipo Chicago:
Gamberale, Romina. "Papel de los receptores para el fragmento Fc de la IgG en la modulación de la apoptosis de los granulocitos neutrofilos". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. .
http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000566_Gamberale

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

LICENCIATURA DE BIOLOGIA No. 566

GAMBERALE, Romina

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

PAPEL DE LOS RECEPTORES PARA EL FRAGMENTO Fc DE LA IgG EN LA MODULACION DE LA APOPTOSIS DE LOS GRANULOCITOS NEUTROFILOS

AUTORA: ROMINA GAMBERALE

DIRECTORES: Dra MIRTA GIORDANO Y Dr JORGE R. GEFFNER

COORDINADOR: Dr EDUARDO ARTZ

DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES HEMATOLOGICAS
ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

DICIEMBRE 1997

TESIS DE LICENCIATURA

№ 566

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo y colaboración de personas a quienes quiero agradecer:

Especialmente a mis directores, Mirta y Jorge, por el esfuerzo que realizaron y toda la ayuda que me brindaron para que fuera posible la realización de este trabajo.

A Mirtus, por todo lo que me enseñaste desde un principio con tanta paciencia y dedicación, por tu alegría y tu cariño. Porque sos una jefa que se dedica personalmente a la formación de sus becarios, porque aprendo mucho de vos, en todo sentido. Por tu confianza, que me ayuda a crecer.

A Jorge, por tu entusiasmo cotidiano y tu alegría al trabajar. Por tu sentido de compañerismo y la disponibilidad para transmitir lo que sabes.

A la Colo, por todo lo que me ayudaste los primeros tiempos de trabajo, siempre con tanta paciencia y cariño. Por tu amistad.

A Analía, Gracielita, Silvina, Daniel, Marina y Caro, porque son buenos compañeros y porque hacen posible que el lugar de trabajo sea lindo.

A Selma, porque sin su colaboración no es posible el trabajo cotidiano.

A Juan Pablo, porque siempre estás cerca, escuchándome y aconsejándome.

A mi familia, que siempre me apoya y alienta para que logre mis objetivos. Especialmente a mis papas, porque gracias a su esfuerzo pude estudiar lo que me gusta.

1.OBJETIVOS.....1

2. INTRODUCCION.....2

A. COMPLEJOS INMUNES Y RECEPTORES PARA EL FRAGMENTO Fc DE LA IgG

A.1. Receptores celulares para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas.....2

A.2. Receptores celulares para el fragmento Fc de la IgG: diversidad estructural y distribución celular.....3

A.3. Transducción de señales a través de los RFcγ: motivos ITAM e ITIM.....5

A.4. El entrecruzamiento de los RFcγ como evento crítico en la activación celular inducida por CI.....6

A.5. Funciones mediadas a través de los RFcγ.....7

A.5.1. Fagocitosis.....7

A.5.2. Producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO).....7

A.5.3. Mecanismos citotóxicos independientes del oxígeno.....11

A.5.4. Liberación de mediadores lipídicos de inflamación.....12

A.5.5. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA).....13

A.6. Papel del los RFcγ en la injuria tisular inducida por CI.....14

B. MUERTE CELULAR: APOPTOSIS VS NECROSIS.....15

B.1. Alteraciones observadas en células apoptóticas.....15

B.2. Bioquímica de la apoptosis.....16

B.3. Reconocimiento de células apoptóticas por fagocitos.....18

B.4. Regulación genética de la apoptosis.....20

B.5.- Apoptosis de neutrófilos.....22

3. MATERIALES Y METODOS.....23

A. REACTIVOS GENERALES.....23

A.1. Solución de Ficoll-Hypaque.....23

A.2. Solución de dextrán.....23

A.3. Tampón fosfato salino (PBS).....23

A.4. Medio de cultivo....23
A.5. Solución de Türk para el recuento de células....24
A.6. Solución de azul tripán....24
A.7. Colorantes para identificación de granulocitos....24
A.8. Reactivos y anticuerpos monoclonales....24
A.9. Obtención de leucocitos de sangre periférica humana....25
A.9.1. Células mononucleares periféricas humanas (CMPH)....25
A.9.2. Granulocitos neutrófilos....25
A.10. Preparación de complejos inmunes (CI)....26
A.10.1. Obtención de IgG de conejo anti-IgG humana (IgGc anti-IgGh)....26
A.10.2. Antígenos empleados para la preparación de los CI....26
A.10.3. Preparación de CI....26
A.10.4. Complejos inmunes precipitantes (CIp)....27
A.10.5. CI solubles (CIs)....27
A.10.6. Preparación de IgG humana agregada....27
A.11. Evaluación de la apoptosis y viabilidad por microscopía de fluorescencia....27
A.12. Citometría de flujo....28
A.12.1. Expresión de moléculas de superficie en los neutrófilos....28
A.12.2. Evaluación de la apoptosis....28
A.12.3. Fluctuaciones en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+}....28
A.13. Emisión de quimioluminiscencia (QL)....29
A.14. Ensayo de fagocitosis....29
A.15. Análisis estadístico de los datos....29
4. RESULTADOS....32
4.1. Los CI modulan la apoptosis de los granulocitos neutrófilos....32
4.2. La estimulación de la apoptosis por CIp o E-IgG está mediada, fundamentalmente, a través del RFcγ IIa....39
4.3. La estimulación de la apoptosis por CIp o E-IgG no requiere de su internalización (fagocitosis)....40
4.4. La promoción de la apoptosis por CIp o E-IgG no involucra el sistema fas/fasL....41

4.5. Análisis comparativo del patrón de activación inducido en el neutrófilo por IgGa y CIp.....43
4.6. Efecto de inhibidores de serino-proteasas y agentes secuestradores de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) sobre la estimulación de la apoptosis de los neutrófilos inducida por CIp.....48
4.7. Efecto de IgGa, CIp e E-IgG sobre la apoptosis de neutrófilos provenientes de un paciente con enfermedad granulomatosa crónica (CGD).....51
5. DISCUSION.....53
6. CONCLUSIONES.....61
7. REFERENCIAS.....62

1. OBJETIVOS

El objetivo central del presente Seminario consiste en definir la acción modulatoria de diferentes ligandos de los RFcγ sobre la progresión del fenómeno apoptótico en los granulocitos neutrófilos humanos, examinando los mecanismos involucrados.

INTRODUCCION

A. COMPLEJOS INMUNES Y RECEPTORES PARA EL FRAGMENTO Fc DE LA IgG

A.1. Receptores celulares para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas

La respuesta inmune transcurre a través de dos carriles diferentes, profundamente integrados : la inmunidad *innata* o *inespecífica* y la inmunidad *adquirida* o *específica*. Esta última, involucra tanto la inmunidad *celular*, mediada por linfocitos T, como la *humoral*, mediada por los anticuerpos producidos a expensas de la activación de los linfocitos B. Ambos tipos de respuestas son inducidas a consecuencia de la interacción establecida entre epitopes antigénicos y receptores de alta especificidad, expresados por clones T y B.

La interacción de anticuerpos y antígenos específicos, conduce a la formación de los complejos inmunes (CI). Ellos participan, de modo relevante, en la etiopatogénesis de numerosas enfermedades humanas : el lupus eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoidea, ciertas glomerulonefritis, vasculitis y una amplia variedad de enfermedades de etiología infecciosa (1). Más alla de su participación en diversos mecanismos inmunes que conducen a la injuria tisular, debe destacarse la relevancia de los CI en la respuesta inmune anti-microbiana. En este sentido, es importante recordar que la interacción de anticuerpos y determinantes antigénicos microbianos es, generalmente, incapaz de neutralizar la capacidad infecciosa y/o patogénica de los microorganismos. Son entonces los CI, los que contribuyen críticamente a este objetivo. Ellos presentan la capacidad, a diferencia de los anticuerpos libres, de activar poderosos mecanismos efectores humorales y celulares fundamentales, no sólo en la inmunología antimicrobiana sino también en la respuesta inmune antitumoral.

Los mecanismos efectores humorales involucran, básicamente, la activación del sistema complemento, iniciada a través de la interacción del fragmento Fc de las IgG e IgM con el componente C1q (primer componente de la vía clásica de activación) (2,3). Dicha activación conduce, por un lado, a la lisis de diferentes tipos de microorganismos y células tumorales y, por otro, al reclutamiento local de células inflamatorias, a consecuencia de la generación *in situ* de potentes agentes quimiotácticos y anafilácticos (2,3).

Los mecanismos efectores celulares son activados a través de la interacción del fragmento Fc de los anticuerpos con sus receptores específicos (RFc). Los RFc cumplen un

papel crítico en la respuesta inmunológica, permitiendo a los anticuerpos inducir la activación de un amplio abanico de funciones, mediadas por diversas poblaciones leucocitarias. Han sido descriptos RFc para cada una de las diferentes clases de anticuerpos: RFcγ, para la IgG; RFcα, para la IgA; RFcμ, para la IgM; RFcδ, para la IgD y RFcε, para la IgE. Desde el punto de vista de la defensa contra infecciones, son los RFcγ y los RFcε, los que parecen jugar un papel de mayor relevancia (4-10).

La mayoría de los RFc pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. En la misma se agrupan moléculas derivadas de un precursor génico común y, en consecuencia, evolutivamente relacionadas y estructuralmente homólogas. Todos sus miembros presentan una estructura tridimensional común, caracterizada por la presencia de al menos un dominio tipo-Ig, homólogo a los dominios C o V de las Igs. Los mismos contienen residuos conservados que les permiten asumir una estructura terciaria característica, compuesta de un arreglo en *sandwich* de dos hojas ß-plegadas estabilizadas por el establecimiento de un puente disulfuro que determina la formación de un lazo de 55 a 75 aa (11).

Las moléculas pertenecientes a la superfamilia de las Igs juegan un papel crítico en el desarrollo de la respuesta inmune. Entre ellas se encuentran las inmunoglobulinas de superficie de linfocitos B, el receptor antigénico de linfocitos T (RCT), los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II, las moléculas CD4, CD8 y CD2, el receptor para PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y las moléculas de adhesión ICAM-1, ICAM-2 y VCAM-1 (11).

A.2. Receptores celulares para el fragmento Fc de la IgG: diversidad estructural y distribución celular

En el hombre han sido descriptos tres clases de RFcγ: el RFcγI (CD64), el RFcγII (CD32) y el RFcγIII (CD 16). Ellas comprenden nueve formas asociadas a membrana y tres formas solubles, codificadas por ocho genes (9-11).

La característica distintiva del RFcγI es la alta avidez por su ligando (K_a = 1-3 x 10^8 M^{-1}), propiedad relacionada con la presencia de tres dominios extracelulares *Ig-like,* a diferencia de las otras dos clases de RFcγ, las cuales expresan sólo dos dominios extracelulares. Constituye el único RFcγ capaz de unir IgG monomérica (9,10). No obstante, su avidez varía frente a distintas subclases de IgG (IgG 1 > IgG 3 > IgG 4 >> IgG 2). Se han

identificado tres genes altamente homólogos, el RFcγA, IB y IC, que codifican para distintas isoformas de este receptor. Los mismos mapean en el brazo largo del cromosoma 1. Los RFcγI se expresan constitutivamente en monocitos y macrófagos; su expresión es inducida por acción del IFNγ, en neutrófilos, células HL-60 y eosinófilos (4-10,12).

El RFcγII se expresa en diversas poblaciones celulares. A diferencia del RFcγI, presenta muy baja avidez por la IgG monomérica ($Ka < 10^7\ M^{-1}$) (4-10,13-15). La unión de la IgG a este receptor sólo puede ser evidenciada empleando IgG complejada o polimérica. Su especificidad es mayor para las subclases IgG1 e IgG3 que para las IgG2 e IgG4. Los RFcγII constituyen una familia de glicoproteínas de 40 kDa que presentan regiones extracelulares similares de 180 aa, conteniendo dos dominios tipo-Ig, una región transmembrana de 27 a 29 aa y dominios citoplasmáticos de longitudes variables (44 a 76 aa). Se han identificado seis isoformas, codificadas por un total de tres genes localizados en el brazo largo del cromosoma 1 (RFcγIIA, IIB y IIC) (5,10). Las principales diferencias entre las isoformas yacen en sus regiones intracitoplasmáticas. Este hecho explica el motivo por el cual los anticuerpos monoclonales (AcM) que reconocen las regiones extracelulares, en general no distinguen entre miembros de la familia (4-10,13-15).

La heterogeneidad de los RFcγII adquiere aún mayor relevancia al considerar la existencia de dos formas alélicas del RFcγIIa. Ellas difieren en su capacidad de inducir la proliferación de células T activadas por AcM anti-CD3 de clase IgG1 murina; los monocitos del 70% de los dadores Caucásicos normales (altos respondedores: HR), sustentan eficientemente la respuesta mitogénica, mientras que el 30% restante (bajos respondedores, LR) no lo hacen (16). Las diferencias funcionales de las dos formas alélicas del RFcγIIa no sólo se expresan en relación a la IgG1 murina. Warmerdam y colaboradores (17), han demostrado que este polimorfismo genético condiciona las respuestas a IgG humana. Los fagocitos de individuos homocigotas para el alelo definido originalmente como $RFc\gamma IIa^{LR}$, unen e internalizan eritrocitos opsonizados con IgG2 humana con mayor eficiencia respecto de los homocigotas para el alelo $RFc\gamma IIa^{HR}$ (17,18). Considerando que la IgG2 cumple un papel prominente no sólo en las infecciones a bacterias encapsuladas como *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*, sino también en la prevención de sepsis bacterianas (19), se ha propuesto que los individuos con fenotipo $RFc\gamma IIa^{HR}$ podrían ser más susceptibles a infecciones bacterianas (7).

El RFcγIII precipita como una banda amplia con pesos moleculares que oscilan entre 50 y 80 kDa, debido a una glucosilación extensiva. Exhibe baja afinidad por la IgG monomérica ($Ka < 10^7 M^{-1}$) y, al igual que el RFcγII, une IgG en forma polimérica con mayor eficiencia. Dos genes altamente homólogos, el RFcγIIIA y el RFcγIIIB, codifican las dos isoformas conocidas, las cuales presentan regiones extracelulares de 190 aa bajo la forma de dos dominios tipo-Ig (4-10). El RFcγIIIA codifica para un receptor transmembrana con una cola citoplamática de 25 aa, que es expresado por macrófagos, células NK y algunas células T (20,21). El producto del gen RFcγIIIB se halla unido a la cara externa de la membrana plasmática a través de un enlace glicosilfosfatidilinositol (GFI). Se expresa constitutivamente en neutrófilos, siendo inducido en eosinófilos por acción del IFNγ. La diferencia más importante entre los productos de ambos genes, radica en el aa 203. El RFcγIIIB codifica para una serina en dicha posición, lo que determina el anclaje vía GFI; mientras que una fenilalanina en el RFcγIIIa determina la preservación de las regiones transmembrana e intracitoplasmática (22,23). Debido al tipo de anclaje, el RFcγIIIb puede ser liberado de las células por tratamiento con fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (22,23). Se ha demostrado, además, la existencia de dos formas alélicas del RFcγIIIB, las cuales codifican a los aloantígenos NA1 y NA2, definidos tanto por serología como por movilidad electroforética. Los PMN que expresan el alotipo RFcγIIIb^{NA1} fagocitan eritrocitos sensibilizados con IgG humana con mayor eficiencia respecto de los que expresan el fenotipo IIIb^{NA2} (24). La relevancia fisiológica de esta observación no ha sido aún establecida.

A.3. Transducción de señales a través de los RFcγ: motivos ITAM e ITIM

Los RFcγI y IIIa existen como complejos heteroligoméricos, compuestos por una cadena α, responsable del reconocimiento del ligando y cadenas accesorias, denominadas γ, β y ξ, las cuales cumplen un papel crítico en la expresión del receptor y en la transducción de señales al interior de la célula. Cada una de estas cadenas accesorias expresa un motivo de 26 aminoácidos, denominado ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), involucrado en la transducción de señales de activación. Un motivo similar, aunque no idéntico, se localiza en la región citoplasmática del RFcγIIa, cumpliendo también un papel

crítico en la inducción de activación celular. Los RFcγIIb no expresan motivos ITAM. Presentan un motivo de trece aminoácidos denominado ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) en sus dominios citoplasmáticos que transduce señales de naturaleza inhibitoria (8-10).

A.4. El entrecruzamiento de los RFcγ como evento crítico en la activación celular inducida por CI

En el CI la molécula antigénica actúa como concentrador espacial de anticuerpos. Ello permite a los CI presentar, a los RFcγ, los fragmentos Fc de los anticuerpos IgG en forma polimérica. De este modo, se establecen interacciones múltiples entre el CI y sus receptores. A consecuencia de ello, no sólo se incrementa la avidez de los fragmentos Fc por los RFcγ, sino que también se induce la agregación de los mismos. Este último evento constituye un requerimiento absoluto para la activación de respuestas celulares inducidas a través de los RFcγ. El mismo explica la incapacidad que presentan, tanto la IgG monomérica como los CI monovalentes, para inducir la activación celular (7-9).

La agregación de los RFcγ conduce a la concentración de los complejos ligando-receptor en *patches* de alta densidad sobre la membrana celular (25,26). La extensión de este fenómeno depende de diferentes variables, tales como la concentración del ligando en la fase fluida, su valencia y afinidad hacia los RFcγ y la densidad de los mismos sobre la superficie celular (27). Este proceso tiende a potenciar la asociación entre CI y RFcγ, no sólo porque la unión se torna irreversible, sino también por las altas concentraciones que los CI alcanzan en la superficie celular. Estudios con técnicas de inmunofluorescencia realizados en macrófagos han detectado la presencia de 80 a 250 *patches* sobre la superficie de cada célula (27). Cada *patch* contendría entre 2000 y 12000 moléculas de anticuerpo (27). Este proceso de acumulación permite que, partiendo de soluciones de CI a una concentración de 10^{-8} M, la concentración efectiva de CI en sitios discretos sobre la superfice del macrófago alcance valores 1000 veces superiores (28). Procesos similares de acumulación de CI, han sido descriptos en linfocitos (25). La relevancia de este proceso, tanto en fagocitos como en células linfoides, es notable, puesto que permite que pequeñas cantidades de CI constituyan estímulos eficientes para la inducción de distintas funciones a través de los RFcγ.

A.5. Funciones mediadas a través de los RFcγ

A.5.1. Fagocitosis

Los fagocitos presentes en el microambiente inflamatorio reconocen al microorganismo invasor, se adhieren a él y lo internalizan (29). La eficiencia de este proceso, denominado fagocitosis, depende tanto del linaje de la célula fagocítica y su estado de activación como de la presencia, sobre la superficie del microorganismo, de moléculas que puedan ser reconocidas por receptores expresados por los fagocitos. Estas moléculas pueden clasificarse en dos grupos diferentes según sean propias al microorganismo o se depositen sobre su superficie a consecuencia de la interacción del agente infeccioso con el sistema inmune del huésped. Este segundo grupo de moléculas, que incluyen a la IgG e IgM y a los factores C3b y C3bi, recibe colectivamente el nombre de opsoninas (29). Ellas facilitan el reconocimiento de los microorganismos por los fagocitos, a través de su interacción con los receptores para los componentes C3b (CR1) y C3bi (CR3) y los receptores para los anticuerpos de clase IgG (RFcγ) e IgM (RFcμ). Para la mayoría de las partículas opsonizadas, las interacciones C3bi-CR3 y C3b-CR1 promueven la adhesión del agente invasor al fagocito pero no su ingestión, mientras que la unión IgG-RFcγ induce la adhesión e internalización (30). Dado que ambos tipos de receptores están presentes sobre los fagocitos, estas opsoninas actúan en forma cooperativa, disminuyendo la cantidad de anticuerpos requerida para inducir la ingestión del microorganismo (31). En todos los casos, la unión del microorganismo promueve en el fagocito la polimerización de actina en la zona subyacente al sitio de contacto, lo que conduce a la extensión de pseudópodos que envuelven a la partícula dando origen a una vacuola fagocítica o fagosoma. En forma simultánea a estos eventos, los lisosomas primarios se unen al fagosoma naciente dando origen a un fagolisosoma. Dentro del mismo, el patógeno es sometido a la acción de dos sistemas citotóxicos de distinta naturaleza, uno dependiente de oxígeno y otro independiente del mismo (29-31).

A.5.2. Producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO)

La activación de las célula fagocíticas por ciertos estímulos inflamatorio conduce a la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) (32). Ellos cumplen un papel relevante no sólo en la destrucción de microorganismos patógenos, sino también en la

generación de lesiones tisulares asociadas a manifestaciones de autoinmunidad (32). Los IRO incluyen radicales oxidantes, halógenos oxidados y el oxígeno singlete. Son generados por reducción parcial del oxígeno molecular a través de un proceso denominado *estallido respiratorio* (32). El mismo se caracteriza por un incremento abrupto en el consumo de oxígeno y la activación de la vía metabólica denominada *desviación de las hexosas monofosfato*, generadora de potencial de reducción bajo la forma de NADPH (32-36).

Todos los IRO producidos por los fagocitos derivan, en última instancia, del anión superóxido (O_2^-) (32). La enzima responsable de su generación es la NADPH oxidasa, que cataliza la reducción univalente del oxígeno molecular utilizando NADPH como dador de electrones, según la siguiente reacción:

$$2\,O_2 + NADPH + H^+ \xrightarrow{\textit{NADPH oxidasa}} 2\,O_2^- + NADP^+ + 2\,H^+$$

La enzima NADPH oxidasa, inactiva en condiciones basales, consta de un componente asociado a la membrana celular, el citocromo b_{558} y dos componentes citoplasmáticos, p67-*phox* y p47-*phox*. El citocromo b_{558} consiste en dos subunidades, una de 22 kDa llamada p22-*phox* y otra de 91 kDa, la gp91-*phox*. Esta última presenta sitios de unión para FAD y NADPH. La activación de la NADPH oxidasa involucra la fosforilación de p47-*phox* y su translocación, junto con p67-*phox*, a la membrana plasmática, donde se ensambla con el citocromo b_{558} y una proteína G monomérica adicional, denominada Rac (35,36). Las mutaciones en cualquiera de los cuatro genes que codifican a los componentes de la NADPH oxidasa dan origen a una patología conocida como enfermedad granulomatosa crónica caracterizada por la incapacidad de los fagocitos para producir O_2^- (37). Ello se asocia a infecciones bacterianas y micóticas recurrentes, las cuales pueden causar la muerte del paciente. El defecto más frecuente se manifiesta en el gen que codifica para gp91-*phox* (incidencia relativa: 56%) (38).

El anión superóxido es capaz de reaccionar con un amplia variedad de sustratos biológicos. No obstante, el mismo no cumpliría, por sí solo, un papel relevante en las respuestas citotóxicas desarrolladas hacia microorganismos y/o células propias del huésped. Esto estaría dado, fundamentalmente, por dos razones: su escaso potencial oxidante (39) y la velocidad y eficiencia con las cuales dos moléculas de anión superóxido interactúan para formar peróxido de hidrógeno (40). Esta reacción puede desarrollarse espontáneamente o ser

catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), según:

$$2\ O_2^- + 2\ H \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

La dismutación espontánea ocurre lentamente a pH neutro (K=4,5x10^5 M^{-1} seg^{-1}), pero se acelera a valores de pH ácidos semejantes a los encontrados dentro del fagolisosoma (K=8,5x 0^7 M^{-1} seg^{-1}) (41,42). Por su parte, la SOD, presente en células eucariótas en dos isoformas, mitocondrial y citoplasmática, cataliza la reacción de dismutación con una K=1,9x 0^9 M^{-1} seg^{-1} (43,44).

El H_2O_2 es un oxidante estable capaz de ejercer efectos tóxicos en distintos sistemas biológicos (45). No obstante, muchos tipos celulares, entre ellos los propios fagocitos y numerosos microorganismos, suelen contener potentes enzimas que detoxifican el H_2O_2, tales como la catalasa y/o la glutatión peroxidasa (46), a través de las siguientes reacciones:

$$H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{Catalasa} 2\ H_2O$$

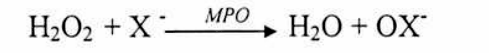
$$H_2O_2 + NADPH \xrightarrow[Glutation]{Glutation\ peroxidasa} H_2O + NADP^+ + H^+$$

La presencia de tales enzimas, en microorganismos y fagocitos, redunda en una resistencia marcada a los efectos tóxicos del peróxido de hidrógeno.

La inhabilidad relativa del anión superóxido y del peróxido de hidrógeno de actuar *per se* como agentes citotóxicos, sostienen la hipótesis de que son otras las especies que dan cuenta del potencial citotóxico de los fagocitos. El mismo estaría dado por la producción de oxidantes más poderosos a expensas de reacciones posteriores que involucran al anión superóxido y al peróxido de hidrógeno, tales como los hipohalitos (XO^-), el radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$) y posiblemente el oxígeno singlete ($^1O_2$) (40).

La producción de hipohalitos involucra la acción de peroxidasas, las que pueden ser liberadas al medio extracelular cuando la célula es estimulada. Ellas incluyen a la mieloperoxidasa (MPO), que se encuentra tanto en neutrófilos como en monocitos (constituyendo en los neutrófilos el 5% de su peso seco) (40) y a la peroxidasa de eosinófilos (EPO). Ambas enzimas catalizan la oxidación de haluros (Cl^-, Br^- y/o I^-) por el H_2O_2

generando aniones hipohalitos según la siguiente reacción:



$$H_2O_2 + X^- \xrightarrow{MPO} H_2O + OX^-$$

donde $X^- = Cl^-, Br^-, I^-$.

Mientras que la MPO emplea como sustrato fisiológico el Cl^-, cuya concentración plasmática es mil veces superior respecto de los otros haluros, la EPO emplea Br^-, no pudiendo oxidar el Cl^- (47).

Debido a la capacidad oxidante extremadamente alta del hipoclorito, una vez producido, rápidamente interactúa con una variedad de moléculas biológicamente relevantes, como ser aminas, aminoácidos, tioles, tioéteres, nucleótidos y hemoproteínas (48). Se calcula que a pH neutro, 10^6 neutrófilos generan $2x10^{-7}$ moles de OCl^-, suficientes para destruir 150 millones de organismos de *E. coli* en milisegundos (40,48). Los efectos citotóxicos atribuibles al hipoclorito incluyen la oxidación y/o decarboxilación de proteínas de membrana, lo que conduce al incremento de la permeabilidad celular (49), oxidación de componentes de la cadena respiratoria bacteriana (49,50) y peroxidación de membranas (51).

El hipoclorito puede reaccionar en forma espontánea con aminas primarias o secundarias dando origen a otras especies oxidantes conocidas como cloraminas, según la siguiente reacción:

$$R'RNH + HOCl \longrightarrow R'RNCl + H_2O$$

Si bien las cloraminas son menos reactivas que el hipoclorito, sus vidas medias suelen ser más prolongadas. Algunas de ellas pueden ser recuperadas de sobrenadantes de neutrófilos luego de 16 horas de ocurrida la activación celular (40).

A pesar de no haberse definido si el hipoclorito o las cloraminas constituyen el mediador final de los efectos tóxicos, la evidencia acumulada sugiere que el hipoclorito, merced a su alta reactividad, ejerce sus efectos tóxicos sobre *blancos* asociados a membrana (40). Este hecho se encuentra sustentado, además, por la naturaleza catiónica de la MPO, propiedad que facilita su adherencia a superficies celulares incrementando la producción local de hipoclorito (47). Por su parte, las cloraminas, especialmente aquellas con características lipofílicas, difundirían a través de la membrana plasmática atacando componentes citosólicos (40).

Los fagocitos son capaces de incrementar la potencialidad tóxica del O_2^- y el H_2O_2 a través de un mecanismo alternativo, consistente en la producción de un oxidante extremadamente reactivo y destructivo, el $OH^\cdot$. Este se origina por la interacción de O_2^- y H_2O_2 en una reacción catalizada por Fe^{3+} (reacción de Haber-Weiss) (40,46,47):

$$O_2^- + Fe^{3+} \text{ —— } Fe^{2+} + O_2$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \text{ —— } Fe^{3+} + OH^\cdot + HO^-$$

$$H_2O_2 + O_2^- \text{ —— } OH^\cdot + HO^- + O_2$$

El $OH^\cdot$ es capaz de reaccionar rápidamente con una amplia variedad de enlaces químicos, causando daño en regiones próximas al sitio de producción.

Se ha postulado también que los fagocitos son capaces de producir una especie sumamente agresiva denominada oxígeno singlete ($^1O_2$). El mismo no constituye por definición un radical libre ya que no presenta electrones desapareados. Las vías responsables de su formación no han sido aún, definidas con claridad (40,46).

A.5.3. Mecanismos citotóxicos independientes del oxígeno

Los fagocitos contienen gránulos en su citoplasma cargados con poderosos agentes antimicrobianos. Los mismos son liberados al fagolisosoma durante la fagocitosis, o al medio extracelular, en el caso de estímulos solubles o estímulos particulados no fagocitables. Las sustancias presentes en los gránulos incluyen enzimas hidrolíticas, tales como fosfolipasas, glucosidasas, lisozima, proteasas y péptidos/proteínas capaces de alterar la fisiología de las células *blanco* (29,52-57).

Las proteasas de mayor relevancia incluyen a la elastasa, la catepsina G, la colagenasa y la gelatinasa. Los fagocitos contienen, además, proteínas tales como la B/PI de neutrófilos (proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad) y los péptidos catiónicos 1 y 2 de los macrófagos, capaces de permeabilizar las membranas bacterianas a través de un mecanismo no enzimático. Presentan también "defensinas", péptidos moderadamente catiónicos, muy abundantes en los gránulos azurófilos de los neutrófilos, que actúan

induciendo alteraciones en la integridad de las membranas de bacterias, hongos y ciertos virus envueltos (52-57).

A.5.4. Liberación de mediadores lipídicos de inflamación

La estimulación de células fagocíticas por CI conduce también a la liberación de mediadores lípidicos de inflamación, cuya acción autócrina o parácrina contribuye al desarrollo de la respuesta inflamatoria (58). En general, ejercen efectos sobre la microvasculatura, afectando las funciones del endotelio, el músculo liso, leucocitos y plaquetas. No son acumulados como mediadores preformados. Son sintetizados *de novo* a expensas de la activación del metabolismo fosfolipídico (58).

La interacción de los CI con los RFcγ induce la liberación de ácidos grasos insaturados desde los fosfolípidos que forman parte de la membrana celular (59), por acción directa de la fosfolipasa A_2, o a través de una acción indirecta mediada por la fosfolipasa C (60). Entre ellos, el ácido araquidónico es el más importante y su disponibilidad, en estado libre, constituye el factor limitante en la síntesis de eicosanoides (61). El mismo puede ser metabolizado por la enzima ciclooxigenasa a prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX) o por la enzima lipoxigenasa, a ácidos hidroperóxidos (HPETEs), ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs) o leucotrienos (LT), (58,62).

En células fagocíticas se han identificado dos isoformas de la enzima lipoxigenasa, la 5- lipoxigenasa y la 15-lipoxigenasa (63). Uno de los productos de la 5-lipoxigenasa, el LT B_4, constituiría un mediador endógeno de la activación leucocitaria (64). Se ha demostrado que es un potente inductor de la quimiotaxis (65), quimioquinesis (migración no dirigida) (66), agregación (67) y liberación de enzimas lisosomales (68), por parte de los neutrófilos. El LTB_4 estimula también el movimiento celular en eosinófilos, linfocitos y monocitos (58) e incrementa la expresión de receptores para C3b en neutrófilos y eosinófilos (68). Otro producto de la 5-lipoxigenasa, el 5-HETE, es un débil estimulador de la actividad leucocitaria (69), sin embargo, es capaz de potenciar sinergísticamente las respuestas de neutrófilos inducidas por LT (70,71).

La 15-lipoxigenasa, presente en neutrófilos y monocitos (72), da origen a dos potentes inhibidores de la actividad NK (73), conocidos como lipoxinas A y B (LXA y LXB). La LXA es capaz, también, de estimular la degranulación y el estallido respiratorio en neutrófilos (72). A diferencia de la 5-lipoxigenasa, cuya actividad puede ser inducida por diferentes estímulos,

la 15-lipoxigenasa puede ser sólo estimulada por los HETEs, los que a su vez median un efecto inhibidor sobre la 5-lipoxigenasa (74).

Por otra parte, en respuesta a una variedad de estímulos específicos, entre ellos los CI, numerosos tipos celulares, tales como fagocitos, plaquetas y células endoteliales, sintetizan otro poderoso mediador inflamatorio conocido como factor de activación plaquetaria (PAF) (1-*O*-alquil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfocolina) (75,76). El PAF contribuye a la inflamación causando la degranulación y agregación plaquetaria (75-78), estimulando la adherencia, agregación y degranulación leucocitaria (79-81), la contracción del músculo liso e incrementando la permeabilidad vascular (82).

A.5.5. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA)

La CCDA constituye un mecanismo citotóxico mediado por diferentes poblaciones efectoras, operativo contra células *blanco* recubiertas por anticuerpos específicos (83). La destrucción de las células *blanco* involucra un proceso no restringido por antígenos de histocompatibilidad, en el cual no participa el sistema complemento. La especificidad de la CCDA esta conferida por los anticuerpos, los que a muy bajas concentraciones (mucho menores que las requeridas para mediar la lisis por complemento en *blancos* susceptibles), inducen la citotoxicidad (83). Pese a que los mecanismos involucrados en la CCDA no han sido elucidados con claridad, en todos los casos, la reacción es activada a través de la interacción de los fragmentos Fc de los anticuerpos IgG que recubren la célula *blanco*, con los RFcγ expresados por las células efectoras. Estas últimas incluyen no sólo subpoblaciones linfocitarias sino también a los leucocitos polimorfonucleares, monocitos, macrófagos y plaquetas (83). A pesar de que hasta el presente no se ha podido determinar en forma concluyente la relevancia de la CCDA *in vivo*, numerosas evidencias sugieren que este mecanismo citotóxico juega un papel importante en la inmunidad antitumoral, antiviral y en el rechazo de órganos transplantados (84).

Ha sido aceptado, clásicamente, que sólo los anticuerpos de clase IgG son capaces de mediar la CCDA. Observaciones realizadas en los últimos años han demostrado que los anticuerpos IgE participan también en la CCDA. Las células capaces de mediar CCDA por IgE incluyen a monocitos, eosinófilos y plaquetas. La reacción involucra el reconocimiento del fragmento Fc de la IgE por los receptores de baja afinidad para la IgE : los RFcεII (83).

A.6. Papel del los RFcγ en la injuria tisular inducida por CI

Los CI que presentan anticuerpos IgG juegan un papel relevante en diversas patologías autoinmunes tales como el LES, la artritis reumatoidea, ciertas glomerulonefritis, vasculitis y diferentes enfermedades de naturaleza infecciosa (85-88). El mecanismo patógenico inducido por los CI, común a todas ellas, es el desencadenamiento de una reacción inflamatoria de tipo II y/ o III (89). De acuerdo a los modelos clásicos, en las mismas participan tres componentes básicos: los CI, el sistema complemento y las células fagocíticas. El mismo adjudica un papel fundamental al complemento, tanto en la fase inicial como en la fase de amplificación de la respuesta inflamatoria. Los componentes C3a y C5a, generados a consecuencia de la activación del sistema complemento por los CI, provocarían la degranulación de mastocitos con la consecuente liberación de aminas vasoactivas, las que incrementan la permeabilidad vascular (2,3). La actividad quimiotáctica del C5a y del C3a sería responsable, por otra parte, del influjo de neutrófilos al sitio inflamado (2,3). Allí, los fagocitos serían activados, tanto por la acción de los componentes C3a y C5a, como también por la interacción directa de los CI con los RFcγ expresados por los fagocitos, produciéndose la liberación de potentes mediadores inflamatorios (2,3). De acuerdo a este modelo, los RFcγ no estarían involucrados en la iniciación del proceso inflamatorio, es decir, en la inducción del infiltrado fagocítico.

Este modelo ha sido reexaminado empleando ratones que no expresan el RFcγI, el RFcγIII y el FcεR1, debido a un defecto genético que les impide sintetizar la cadena γ (90). Al intentar reproducir la reacción de Arthus, se observó que el depósito tisular de CI no indujo una reacción inflamatoria significativa. Tanto el edema como la hemorragia y la infiltración de neutrófilos fueron mínimos comparados con lo observado en ratones controles (91). La ausencia de neutrófilos es particularmente relevante. Sugiere que los RFcγ juegan un papel crítico en la fase inicial de la cascada inflamatoria, es decir, en el reclutamiento (quimiotaxis) de los fagocitos (90-91).

B. MUERTE CELULAR: APOPTOSIS VS NECROSIS

La muerte celular puede transcurrir a través de dos procesos diferentes: necrosis y apoptosis. La necrosis se conoce también como muerte accidental y se asocia generalmente a la existencia de procesos extensivos de daño tisular severo. En la célula necrótica, la membrana plasmática constituiría el sitio crítico donde se produce la injuria temprana, merced a la cual la célula pierde, en forma irreversible, la capacidad de regular su medio interno. El proceso necrótico involucra la lisis celular y la consiguiente liberación del contenido citoplasmático al medio extracelular provocando y/o exacerbando una respuesta de naturaleza inflamatoria (92-94).

La apoptosis, descripta en el año 1972 (92), deviene de la activación de un mecanismo suicida, programado genéticamente, conducente a la eliminación de células potencialmente perjudiciales para el organismo (94-99). A diferencia de la necrosis, la apoptosis se relaciona con procesos de homeostasis observables en condiciones fisiológicas. Cumple un papel crítico en procesos tan diversos como el desarrollo embrionario, la reparación tisular y en la homeostasis del sistema inmune (94,99,100)

B.1. Alteraciones observadas en células apoptóticas

En el desarrollo del proceso apoptótico se manifiestan un conjunto de alteraciones morfológicas, comunes a diversos tipos celulares. Ya en etapas tempranas, se observa una disminución en el tamaño de la célula, proceso asociado a la pérdida de agua intracelular. Los mecanismos responsables del proceso de extrusión de agua no han sido dilucidados. Se sabe, no obstante, que los mismos no conducen a alteraciones en la presión osmótica de sus compartimentos internos (92,94,99).

El colapso nuclear constituye un fenómeno crítico en el proceso apoptótico, observándose una marcada condensación de la cromatina en áreas que muestran una clara asociación con la envoltura nuclear (92-94,99).

En la membrana citoplasmática, se observan profundos pliegues y arrugas, generadas a través de un proceso denominado *zeiosis*. Es importante destacar, no obstante, que la membrana citoplasmática no muestra pérdida de integridad o alteraciones mayores en su permeabilidad (92,94,99).

Por último, dependiendo del tipo celular, suele observarse en etapas tardías fragmentación celular en forma de cuerpos apoptóticos, los cuales mantienen sus gradientes osmóticos (92,94,99).

El destino final de la célula apoptótica es ser endocitada por fagocitos profesionales u otros tipos celulares, tales como fibroblastos y células epiteliales, a través de un proceso no conducente a la liberación de mediadores inflamatorios (100,101). Este proceso de remoción de células apoptóticas es sumamente eficiente. Ello explica que, en preparados histológicos, las células apoptóticas suelan observarse, preferencialmente, en el citoplasma de otros tipos celulares (102-104).

Es importante destacar que, en franca oposición a lo observado en la necrosis, durante el desarrollo del proceso apoptótico la membrana citoplasmática permanece intacta, por lo tanto, el contenido celular no es liberado al medio circundante (92-94, 99).

B.2. Bioquímica de la apoptosis

Durante el proceso apoptótico se han descripto numerosas alteraciones ultraestructurales como así también la activación de diferentes sistemas enzimáticos. No obstante, no resulta evidente si las modificaciones observadas constituyen partes esenciales del proceso apoptótico o, por el contrario, constituyen modificaciones generadas a consecuencia de la puesta en marcha del mismo.

La apoptosis se asocia con la activación de endonucleasas, responsables de degradar el ADN cromosómico. Este proceso transitaría en dos etapas. Mientras que en la primera de ellas, el ADN es degradado en fragmentos grandes (50-300 kilobases) (105-107), en la segunda es degradado en pequeños fragmentos oligonucleosomales (108). Ambos procesos podrían estar mediados por diferentes endonucleasas (109). Teniendo en cuenta la prominencia de los cambios nucleares en las etapas tempranas del proceso apoptótico, se ha sugerido que el evento crítico en la inducción de la apoptosis residiría en la activación de endonucleasas y el clivaje del ADN. Esta presunción, sin embargo, parece estar cuestionada por observaciones que indican que, aún en células carentes de núcleo, los cambios citoplasmáticos característicos de la apoptosis pueden ser inducidos (94,95,99,) Debe considerarse, por otra parte, que tanto la condensación de la cromatina como la degradación del ADN pueden ser observadas en núcleos aislados, en sistemas libres de células (95).

Trabajos recientes indican que una de las primeras manifestaciones comunes a los fenómenos apoptóticos está dada por el desarrollo de alteraciones en la funcionalidad de la membrana mitocondrial, las que incluyen la disipación de su potencial transmembrana. Esta alteración marcaría el *punto de no retorno* del proceso apoptótico. El colapso del potencial transmembrana estaría relacionado con la apertura de poros de transición de permeabilidad (PT), constituidos por complejos multiproteicos, localizados en los sitios de contacto de las membranas mitocondriales externa e interna (99). Los mecanismos conducentes a la modulación de la actividad de los PT no han sido aún definidos con claridad (99).

Numerosas evidencias, obtenidas en años recientes, sugieren que la activación de proteasas intracelulares juega un papel crítico en el inicio de la apoptosis (110). Esta presunción se halla avalada por observaciones realizadas en diferentes modelos, durante los estadios tempranos del proceso apoptótico. Se ha observado: a) un patrón reproducible y conservado de clivaje de proteínas celulares (111,112), b) la capacidad de ciertos inhibidores de proteasas de prevenir la progresión de la apoptosis (113), c) la inducción de apoptosis por sobreexpresión de ciertas proteasas (transfección génica) (114) y d) su prevención por eliminación de los genes que codifican para las mismas (115).

Se han desarrollado diferentes protocolos experimentales a fin de identificar a las proteasas involucradas en la inducción de la apoptosis. En este sentido, merecen mencionarse los estudios genéticos llevados a cabo en el nematode *Caenorhabditis elegans.* De las 1090 células que posee este nematode, 131 desarrollan apoptosis durante el desarrollo embrionario. Los genes involucrados en la inducción de la misma han sido identificados como ced-3 y ced-4, a través de estudios realizados en modelos *knockout* (116). Se ha establecido que el gen ced-3 codifica para una proteasa que presenta una extensa homología (29% de identidad aminoacídica) con la enzima convertidora de IL-1β (ICE) (117), una proteinasa de cisteína responsable del clivaje del precursor inactivo de la IL-1β y la consecuente producción de la enzima activa (118). Estas observaciones sugieren que proteasas similares a la ICE, que actualmente se hayan incluidas en una familia de proteasas relacionadas, podrían jugar un papel importante en el desarrollo de la apoptosis (119). La familia ICE/ced-3 incluye diferentes especies: CED-3, Nedd2/Ich-1, CPP32, TX/Ich-2, TY/ICE_{rel}III, Mch3-5, entre otras. Los miembros de la familia ICE/ced-3 se encuentran almacenados en su forma inactiva. La conversión en su forma activa requiere clivaje proteolítico, con frecuencia de naturaleza autocatalítica (110).

Son numerosas las observaciones, realizadas por diferentes grupos, que sugieren un papel crítico para las ICE en la inducción de la apoptosis. Su sobreexpresión (transfección génica) ha demostrado incrementar la apoptosis de fibroblastos de rata (120). La inducción de mutaciones en sus sitios activos, por el contrario, es capaz de prevenirla en células transfectadas (121). Evidencias adicionales indican, no sólo que las ICE son activadas durante el proceso apoptótico, sino también que inhibidores selectivos de las misma retardan la progresión del proceso apoptótico (120-122). Fenómenos similares se han observado en ratones deficientes en ICE (115,119,123).

Es conocido el papel fundamental que juegan ciertas proteasas en los fenómenos citotóxicos mediados por diferentes subpoblaciones linfocitarias. Los linfocitos citotóxicos: linfocitos T citotóxicos, células NK (*natural killer*) y células *killer* activadas por linfoquinas (LAK) inducen la apoptosis de diferentes células *blanco* por agregación de los receptores de FAS presentes en el *blanco* y/o a través de la exocitosis de ciertos gránulos citoplasmáticos. El contenido de dichos gránulos incluye a la perforina (una proteína formadora de poros) y un conjunto de proteasas de serina denominadas granzimas (124,125). Las perforinas actuarían facilitando la penetración al *blanco* de las granzimas, las cuales mediarían la inducción de la apoptosis (126,127).

Los estudios mencionados sugieren que ciertas proteasas juegan un papel crítico en la fase activa de la apoptosis. No obstante, la información recogida es fragmentaria y numerosos interrogantes no han sido aún resueltos, entre ellos: a) el modo en el cual se coordinan e integran las acciones mediadas por diferentes proteasas y endonucleasas; b) los estímulos responsables de la activación de las proteasas; c) la identidad de los sustratos sobre los cuales las proteasas actúan y d) las consecuencias biológicas asociadas al clivaje de dichos sustratos.

B.3. Reconocimiento de células apoptóticas por fagocitos

Las células apoptóticas son rápidamente removidas a través de un proceso que involucra su reconocimiento y posterior fagocitosis por macrófagos y fagocitos no profesionales, tales como células epiteliales y fibroblastos (102,103). En años recientes, se han desarrollado numerosos trabajos a fin de definir la naturaleza de las interacciones establecidas por fagocitos y células apoptóticas que conducen a la fagocitosis de estas últimas. Observaciones realizadas en el nematode *Caenorhabditis elegans* mostraron que mutaciones en 7 genes diferentes son

capaces de impedir la ingestión de las células apoptóticas (97, 128). Ello sugiere que diferentes proteínas estarían involucradas en el mecanismo básico de reconocimiento.

Al menos tres sistemas de receptores parecen ser relevantes en el reconocimiento de células apoptóticas por macrófagos. El primero, descripto originalmente por Duvall y colaboradores en timocitos (129), involucra la interacción de lectinas, expresadas por el macrófago y azúcares simples presentes en la superficie de las células apoptóticas. Este tipo de interacción no se plantea entre macrófagos y timocitos frescos. Ello sugiere que, durante el proceso apoptótico, las células desarrollan cambios en su composición superficial de hidratos de carbono (130). En este sentido, se ha propuesto que la pérdida de ácido siálico, observada en timocitos apoptóticos, podría favorecer la exposición de ciertos hidratos de carbono, permitiendo su reconocimiento por lectinas expresadas por el macrófago (131).

A diferencia de lo observado en timocitos, el reconocimiento de neutrófilos apoptóticos por macrófagos no parece involucrar mecanismos mediados a través de lectinas. Los macrófagos reconocerían no sólo a los neutrófilos apoptóticos, sino también a eosinófilos, timocitos y linfocitos apoptóticos a través de un complejo mecanismo que involucra, en primer término, al receptor de vitronectina ($\alpha_v\beta_3$), perteneciente a la familia de las integrinas (132). Contrariamente a lo esperado, el ligando de la integrina $\alpha_v\beta_3$ no se expresa sobre la superficie de las células apoptóticas. Trabajos desarrollados por Savill y colaboradores en el año 1992 (133), demostraron que la integrina $\alpha_v\beta_3$ reconoce a una proteína denominada trombospondina (TSP), secretada por el propio fagocito. La TSP es una glicoproteína trimérica multifuncional secretada por diversos tipos celulares e implicada en fenómenos tan diversos como agregación plaquetaria, embriogénesis, proliferación de células musculares lisas, metástasis tumoral y un amplio espectro de procesos fisiopatológicos que involucran fenómenos de adhesión establecidos entre células y/o entre células y la matriz extracelular (134). Este particular perfil funcional guarda relación con su capacidad de ser reconocida por diferentes receptores celulares: lípidos sulfatados, proteoglicanos, integrinas (particularmente la $\alpha_v\beta_3$) y la GPIV (CD36) (135,136). En relación al mecanismo de reconocimiento de células apoptóticas, numerosas evidencias indican que la TSP establecería un puente molecular entre el fagocito y la célula apoptótica. El reconocimiento de la TSP, por parte del fagocito, estaría dado no sólo por la integrina $\alpha_v\beta_3$ sino también por el CD36 (133). El receptor de TSP, expresado por células apoptóticas, no ha sido aún caracterizado. Es importante destacar que este particular mecanismo de reconocimiento puede ser mediado tanto por fagocitos profesionales como por otros tipos celulares, tales como fibroblastos y células mesangiales (137,138).

Durante el transcurso del proceso apoptótico suelen observarse alteraciones en la distribución de ciertos fosfolípidos presentes en la membrana citoplasmática (130). La exposición hacia el medio externo de fosfatidilserina (PS) constituye, en este sentido, la manifestación de mayor relevancia, de acuerdo a observaciones realizadas en timocitos, líneas celulares T citotóxicas y neutrófilos. Este cambio se asocia a alteraciones en la hidrofobicidad, carga y actividad procoagulante de la superficie celular, y permite, además, el reconocimiento de células apoptóticas a través de receptores específicos para PS expresados por el macrófago. Este mecanismo de reconocimiento contribuiría también a la remoción de los neutrófilos apoptóticos (139).

La multiplicidad de mecanismos capaces de mediar la remoción de células apoptóticas por fagocitos plantea un interrogante adicional: el impacto de cada uno de ellos en diferentes situaciones fisiopatológicas. Esta cuestión no ha sido aún convenientemente analizada. No obstante, la prevalencia de uno u otro mecanismo parece depender de varios factores: la especie animal, la estirpe de la célula apoptótica, el tipo de fagocito involucrado en su depuración, como así también su procedencia y nivel de activación (139).

B.4. Regulación genética de la apoptosis

Estudios desarrollados en 1984 por Duke y Cohen demostraron que la inhibición en la síntesis de ARN o proteínas inhibe la apoptosis en timocitos (140), sugiriendo la existencia de genes capaces de regular el proceso apoptótico. Algunos de ellos resultaron ser oncogenes, tales como c-myc y bcl-2. En otros modelos, sin embargo, se observó que el empleo de agentes inhibidores de la síntesis de ARN o proteínas inducía la apoptosis (141). Estos hallazgos sugirieron que la apoptosis puede tener lugar a través de vías dependientes o independientes de la neosíntesis proteica (142).

El c-myc es un oncogen asociado normalmente con proliferación. No obstante, su expresión parece ser necesaria para la inducción de apoptosis en ciertos sistemas, tales como hibridomas T estimulados por anticuerpos anti-CD3 (143,144). La expresión de una u otra actividad, por parte del c-myc, parece depender de la presencia de factores de crecimiento. Mientras que en presencia de tales factores el c-myc induciría proliferación, en su ausencia induciría apoptosis (143,144).

El gen bcl-2 fue inicialmente identificado como un oncogen activado en la translocación cromosómica t(14;18), encontrada con alta frecuencia en linfomas a células B foliculares (145).

Bcl-2 es una proteína intracelular asociada con membranas del núcleo, mitocondrias y retículo endoplásmico. Previene la apoptosis y constituye un factor relevante en la sobrevida de linfocitos T y B no activados, de acuerdo a observaciones realizadas en ratones *knockout* para bcl-2 (146). Los neutrófilos maduros no expresan bcl-2, pero sí lo hacen sus precursores (147,148). Experiencias desarrolladas por Lagasse y Weissman en el año 1994 (149) demostraron, en ratones transgénicos para bcl-2, una inhibición significativa en la apoptosis de los neutrófilos maduros, asociada a la expresión de bcl-2.

Evidencias recientes indican que el gen bcl-2 integra, en realidad, una creciente familia de genes relacionados con el control de la apoptosis, cuyos miembros pueden mediar su prevención o su inducción. Aquellos involucrados en la prevención de la apoptosis incluyen bcl-2, bcl-X_L, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1, y a1. Los involucrados en su inducción incluyen bax, bak, bcl-X_S, bad, bid, bik y hrk (99, 150,151). La proporción en la cual ambos grupos de genes se expresan parece determinar, en gran medida, la capacidad celular de responder a un estímulo apoptótico (99).

El gen p53 ha demostrado tener un papel importante en la inducción de apoptosis de líneas celulares mieloides (152). Observaciones realizadas en ratones *knockout* para indican, por otra parte, que agentes capaces de alterar el ADN tales como drogas quimioterapeúticas y radiación ionizante requieren p53 para inducir apoptosis en timocitos (153,154).

Por último, el sistema Fas (Apo-1, CD95)/FAS ligando (FasL) cumple un rol fundamental en la estimulación de la apoptosis en diferentes sistemas. Fas es una proteína de membrana (45kD) perteneciente a la familia de receptores para TNF (155-158). La activación del Fas por el FasL, conduce a la apoptosis. El sistema puede funcionar de modo autócrino, cuando el Fas es activado por el FasL expresado en la misma célula o de modo parácrino, cuando el Fas es activado por el FasL expresado en un segundo tipo celular. El FasL suele presentarse en forma de trímero (157,159) y activa al Fas induciendo su oligomerización (160-162). Si bien el mecanismo de acción del sistema Fas/FasL no ha sido caracterizado aún, evidencias recientes sugieren que la oligomerización del Fas permite la interacción de su dominio citoplasmático letal con ciertas proteasas, las cuales serían responsables de la posterior activación de proteasas pertenecientes a la familia ICE/ced-3 (160-162). El sistema Fas/FasL juega un papel relevante en la fisiología del sistema inmune. Media la deleción de linfocitos T periféricos activados, fenómeno relevante en el control de la expansión clonal T (163-165). Estaría involucrado también la deleción de clones B periféricos autorreactivos (166). Juega,

además, un papel relevante en la actividad citotóxica de células T $CD8^+$ (167), donde constituye una vía citotóxica alternativa a la mediada por perforinas y granzimas (168) .

B.5.- Apoptosis de neutrófilos

La vida media del neutrófilo, luego de su extravasación, es de aproximadamente 6 a 48 horas. Su muerte transitaría, normalmente, a través de un mecanismo apoptótico. La apoptosis de los neutrófilos juega un papel fundamental en la resolución de los procesos inflamatorios agudos. Los neutrófilos apoptóticos, a diferencia de los necróticos, no liberan su contenido autotóxico y proinflamatorio en el seno del tejido injuriado. Ello puede explicarse en función de dos fenómenos: a) el mantenimiento de la integridad de la membrana citoplasmática en los neutrófilos apoptóticos y b) su rápida remoción por diferentes tipos de fagocitos (100,101). La progresión de la apoptosis, por otra parte, ha mostrado asociarse con una marcada pérdida de su funcionalidad, evaluada en función de diferentes parámetros tales como su capacidad de generar IRO, liberar enzimas lisosomales y/o mediar fenómenos de adherencia y quimiotaxis (169-171).

Numerosos mediadores inflamatorios son capaces de inhibir la apoptosis de los neutrófilos, preservando su funcionalidad: LPS (172, 173) , TNF-α (174), G-CSF (173,175), GM-CSF (172,175), IL-1 (173), IL-2 (176) e IL-15 (176). Por otra parte, se han descripto resultados en relación al efecto de C5a, fMLP (173, 177) e IL-6 (173,175) . Los mecanismos a través de los cuales estos agentes modulan el proceso de apoptosis de los neutrófilos no son conocidos. Ello refleja, en gran medida, el desconocimiento de los eventos bioquímicos responsables de la inducción de apoptosis.

Los genes bcl-2, bcl-x, c-myc y p53 no se expresan en neutrófilos maduros. Trabajos desarrollados en el año 1996 por Klebanoff y colaboradores (178) demostraron que los neutrófilos, a diferencia de de los eosinófilos y monocitos expresan no sólo Fas sino también el FasL. El sistema Fas/FasL actuaría como un potente promotor de la apoptosis de los neutrófilos. Merece destacarse que a diferencia de los observado en linfocitos T, en donde la activación celular induce la expresión de Fas y FasL, la expresión del sistema Fas/FasL en neutrófilos es constitutiva (178). Ello sugiere una posible participación del mismo en el rápido desarrollo del proceso apoptótico, característica sobresaliente del neutrófilo maduro.

3. MATERIALES Y METODOS

A. REACTIVOS GENERALES

A.1. Solución de Ficoll-Hypaque

Las células mononucleares periféricas (CMPH) y los leucocitos polimorfonucleares (PMN) fueron purificados mediante el empleo de una solución de Ficoll-Hypaque preparada según el método descripto por Boyum (179). A 2,4 volúmenes de Ficoll 400 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) al 9% en agua destilada, se le agregó un volumen de Hypaque al 34% (Gobby-Novag, Argentina), siendo la densidad final de la solución a 4°C de 1,077 g/l.

A.2. Solución de dextrán

La solución de Dextrán (266 kD) se preparó al 6% en tampón fosfato salino (Sigma, St. Louis, USA).

A.3. Tampón fosfato salino (PBS)

La solución fue preparada con NaCl 0,138M, KCl 0,027M, Na_2HPO_4 0,078M y $KHPO_4$ 0,015M; pH=7,4.

En algunos ensayos, las células fueron resuspendidas en PBS suplementado con 0,1% de seroalbúmina bovina (SAB), $CaCL_2$ 1mM y $MgCl_2$ 1mM (PBSsup).

A.4. Medio de cultivo

Se empleó medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO Lab., Grand Island, USA), suplementado con suero fetal bovino (SFB) inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 minutos (GIBCO Lab) y gentamicina (50μg/ml).

A.5. Solución de Türk para el recuento de células

Se preparó una solución con violeta de genciana (100mg), ácido acético glacial (31,25ml) y agua destilada (c.s.p. 500ml). Para el recuento de células se realizó una dilución 1:20 en esta solución y se procedió al recuento en cámara de Neubauer.

A.6. Solución de azul tripán

La misma se preparó a partir de dos soluciones madres con el siguiente contenido: solución A, azul tripán: 0,14%; solución B, cloruro de sodio: 4,25%. La solución de trabajo se obtuvo mezclando 4 partes de A y una parte de B. Para la determinación de la viabilidad celular las muestras fueron centrifugadas, el sobrenadante descartado y el residuo celular incubado con la solución de azul tripán por 3 minutos a temperatura ambiente. Luego, se procedió al recuento diferencial de las células que excluían el colorante (células viables) y de aquellas que lo incluían (células muertas).

A.7. Colorantes para identificación de granulocitos

El porcentaje de neutrófilos presente en las suspensiones de granulocitos, se determinó a través del recuento diferencial en extendidos coloreados con May-Grünwald-Giemsa.

A.8. Reactivos y anticuerpos monoclonales

Las siguientes drogas fueron usadas : naranja de acridina, bromuro de etidio, ioduro de propidio, citochalasina B, luminol, inhibidor de tripsina y quimiotripsina (de Soybean, 10.000 unidades BAEE/mg proteína), catalasa (hígado bovino, 50.000 U/mg proteína), superóxido dismutasa (de eritrocitos bovinos, 5.000 U/mg protein (Sigma, St. Louis, MO, USA) y aprotinina (Behring, Alemania, 20.000 UIK/ml). Los anticuerpos monoclonales (Acm) 3G8 (IgG1), el cual reconoce al RFcγIII y el IV3, que reconoce al RFcγII, fueron comprados a

Medarex (West Lebanon, NH, USA). Los Acm IgM anti-fas (CH-11) e IgG1 anti-fasL (G247-4 y NOK-1) fueron comprados a Pharmingen (San Diego, CA, USA). En los estudios de bloqueo, los neutrófilos fueron pretratados con los Acm durante 30 minutos a 4°C, empleando concentraciones de anticuerpos entre 3 y 5 veces mayores a las necesarias para saturar todos los sitios de unión, de acuerdo a ensayos de citometría de flujo.

A.9. Obtención de leucocitos de sangre periférica humana

A.9.1. Células mononucleares periféricas humanas (CMPH)

Las CMPH fueron obtenidas a partir de sangre de dadores normales (Sección Hemoterapia-IIHEMA-Academia Nacional de Medicina) recogida sobre heparina o sobre citrato de sodio. La sangre fue diluída al medio con solución fisiológica y sembrada sobre una solución de Ficoll-Hypaque formando un sistema bifásico, el cual fue centrifugado a 350 x g durante 30 minutos a 4°C (179). La interfase conteniendo las CMPH fue lavada 3 veces con medio de cultivo, realizándose luego el recuento celular y el análisis de viabilidad. Por último, las células fueron resuspendidas en el medio adecuado, de acuerdo al experimento a desarrollar. En todos los casos, la viabilidad fue superior al 98% y el grado de contaminación con PMN fue menor al 5%.

A.9.2. Granulocitos neutrófilos

El sedimento de eritrocitos y granulocitos, obtenido según **A.10.1**, fue diluido al medio con solución fisiológica. Luego se agregó dextrán al 6%, en una proporción de tres volúmenes de suspensión celular a un volumen de dextrán. Se dejó sedimentar 30 minutos a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante rico en granulocitos y se lavó con solución fisiológica. Los eritrocitos contaminantes fueron eliminados por shock osmótico con agua destilada durante 30 segundos a 4°C, restituyendo inmediatamente la isotonicidad. Las preparaciones contuvieron más de 94% de granulocitos, de los cuales el 95-98% fueron neutrófilos.

En un grupo particular de experimentos, los neutrófilos fueron purificados de muestras de sangre heparinizada por sedimentación en dextrán y posterior centrifugación a 50-70 g por 5 minutos. Las suspensiones celulares así obtenidas contuvieron células mononucleares (15-35%) y neutrófilos (65-85%). Los eritrocitos contaminantes no fueron removidos; por lo tanto,

estuvieron presentes en concentraciones 5 a 10 veces superiores respecto de las concentraciones de los leucocitos.

A.10. Preparación de complejos inmunes (CI)

A.10.1. Obtención de IgG de conejo anti-IgG humana (IgGc anti-IgGh)

El antisuero se obtuvo por inmunización de conejos con IgG humana (IgGh) purificada cromatográficamente (Sigma, St. Louis, USA). El esquema de inmunización consistió en una primera inoculación subcutánea de IgGh, emulsionada en adyuvante de Freund completo y dos inoculaciones subcutáneas de IgGh, emulsionadas con adyuvante de Freund incompleto, 10 y 30 días después de la primera inoculación. Cuarenta días después de la primera inoculación, el conejo fue sangrado y la IgG fue obtenida por precipitación del suero inactivado con sulfato de amonio al 50% y cromatografía en DE-52 celulosa (Whatman Paper Co). Posteriormente, la IgG de conejo fue pasada a través de una columna de afinidad de IgGh polimerizada con glutaraldehído, preparada según el método descripto por Avrameas y Ternynck (180). La IgGc anti-IgGh fue eluída de la columna con solución tamponada de glicina-clorhídrico 0,1M pH=2,8 y dializada contra PBS.

A.10.2. Antígenos empleados para la preparación de los CI

Se empleó IgGh purificada cromatográficamente (Sigma, St. Louis, USA). Con el objeto de eliminar contaminantes, la IgGh fue adsorbida a una columna de proteína G acoplada a Sepharosa (Sigma), eluida a pH ácido y dializada contra PBS.

A.10.3. Preparación de CI

Los CI fueron preparados en base a curvas de precipitación cuantitativa, realizadas mediante el empleo de antígenos o anticuerpos marcados radioactivamente con ^{125}I (New England Nuclear, Boston, MA). La iodinación de proteínas fue realizada siguiendo un protocolo descripto previamente (181), alcanzándose un nivel de marcación de 10 a 40 μCi de ^{125}I/mg de proteína. Los puntos de equivalencia fueron definidos como las concentraciones a las cuales la marca en el precipitado fuera máxima. En todos los casos, previo a la preparación de los CI, los

antígenos y anticuerpos fueron centrifugados a 50.000 x g durante 1 hora a 4°C, para remover agregados de alto peso molecular.

A.10.4. Complejos inmunes precipitantes (CIp)

Los CIp fueron preparados en la zona de equivalencia, mediante incubación del antígeno (IgGh) y el anticuerpo (IgGc anti-IgGh), durante 1 hora a 37°C y 18 horas a 4°C. Posteriormente, los CIp así formados fueron lavados 3 veces con PBS y resuspendidos a una concentración de 1mg/ml.

A.10.5. CI solubles (CIs)

Se prepararon con IgGc anti-IgGh e IgGh. Los CI fueron formados en 5 veces exceso de antígeno, incubando antígenos y anticuerpos por 30 minutos a 37°C y 1 hora a 4°C. Posteriormente, fueron centrifugados 10 minutos a 10.000 x g y los sobrenadantes empleados como CI solubles.

A.10.6. Preparación de IgG humana agregada

La IgGh (5 mg/ml), previamente liberada de contaminantes por adsorción a proteína G acoplada a Sepharosa, fue incubada durante 12 minutos a 63°C. Posteriormente se centrifugó a 10.000 x g por 5 minutos, descartándose el precipitado. El sobrenadante, ajustado a la concentración deseada, fue empleado como IgGh agregada.

A.11. Evaluación de la apoptosis y viabilidad por microscopía de fluorescencia

Fue realizada de acuerdo a protocolos descriptos previamente (182,183), empleando naranja de acridina (100 μg/ml), a fin de identificar a las células apoptóticas y bromuro de etidio (100 μg/ml), con el objeto de discriminar células viables y no viables. Con esta metodología, los núcleos de células no apoptóticas muestran variaciones en su intensidad de fluorescencia, reflejando la distribución de eucromatina y heterocromatina. Por el contrario, los núcleos apoptóticos se caracterizan por presentar una cromatina marcadamente condensada, la cual es

uniformemente teñida por el naranja de acridina. A fin de establecer los porcentajes de células apoptóticas, al menos 200 células fueron examinadas en cada experimento.

A.12. Citometría de flujo

Todos los experimentos fueron evaluados empleando un citómetro de flujo Becton Dickinson (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA).

A.12.1. Expresión de moléculas de superficie en los neutrófilos

Se realizó, en todos los casos, mediante el empleo de anticuerpos monoclonales específicos e inmunoflorescencia indirecta, adquiriendo 10.000 eventos.

A.12.2. Evaluación de la apoptosis

Los porcentajes de núcleos con contenido de ADN hipodiploide, fueron determinados de acuerdo al protocolo de Nicoletti (184), con ligeras modificaciones. Los *pellets* celulares (2.5 x 10^6 neutrófilos), fueron resuspendidos en 400 μl de una solución hipotónica de fluorocromo, conteniendo 50 μg/ml de ioduro de propidio (IP), 0.1 % de citrato de sodio y 0.1% de Triton X-100. Luego de una incubación de 2 horas a 4°C, la fluorescencia de núcleos individuales coloreados por el IP fue determinada por citometría de flujo. La fluorescencia emitida por núcleos con contenido de ADN diploide, fue fijada a nivel del canal 250 en la escala logarítmica. Los núcleos apoptóticos (hipodiploides), emitieron fluorescencia en los canales 4 a 200 de la misma.

A.12.3. Fluctuaciones en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+}

Los cambios en los niveles intracelulares de calcio $[Ca^{2+}]_i$ fueron monitoreados empleando el compuesto fluo-3-AM, de acuerdo a descripciones previas (185). Los neutrófilos, suspendidos a una concentración de 5 x 10^6 células/ml en medio de cultivo RMPI 1640, fueron incubados con fluo-3-AM (4 μM) durante 30 minutos a 30°C. Luego, las células marcadas fueron lavadas dos veces y resuspendidas a una concentración de 5 x 10^6 células/ml en RMPI 1640 suplementado con 5 % de suero fetal bovino. Alícuotas de 50 μl de esta suspensión celular

fueron añadidas a 450 µl de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino y 1 mM $CaCl_2$. Las muestras fueron luego inmediatamente adquiridas y la fluorescencia basal (FL1) medida durante 30 segundos. Luego, las células fueron estimuladas con los CI y la fluorescencia fue medida por un periodo adicional de 300 segundos. La adquisición de las muestras se realizó a 37°C. Las fluctuaciones en $[Ca^{2+}]_i$ fueron reconocidas como alteraciones en las intensidad de fluorescencia (FL1) en el tiempo. Los datos fueron analizados empleando el programa CellQuest (Becton-Dickinson). Las células cuyos $[Ca^{2+}]_i$ se incrementaron a valores superiores respecto de aquellos expresados por el 97% de las células controles, se consideraron células activadas.

A.13. Emisión de quimioluminiscencia (QL)

La respuesta luminiscente fue cuantificada con un lumiagregómetro (Chrono-log) a 1000 rev/minuto y a 37°C, en presencia de luminol (10^{-7}M) (186), registrándose la emisión de luz en forma continua durante 10 minutos. Los resultados fueron expresados como unidades relativas de QL (URQL). Una URQL fue definida como el corrimiento de un cm en la emisión de la señal luminosa, la cual fue registrada automáticamente.

A.14. Ensayo de fagocitosis

El ensayo fue realizado incubando, durante 30 minutos a 37° C, 100 µl de una suspensión de neutrófilos (5 x 10^6/ml) y 100 µl de una suspensión al 2% v/v de [^{51}Cr]-Ep, previamente sensibilizados con diferentes concentraciones de IgG de conejo anti-Ep. Luego, los Ep no ingeridos fueron eliminados por shock osmótico con agua destilada (30 segundos a 4°C), restituyéndose inmediatamente la isotonicidad. La radioactividad presente en los Ep ingeridos fue detectada en un contador gamma (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, California). Los resultados fueron expresados como índice fagocítico (IF), el cual representa el número medio de Ep ingeridos por 100 neutrófilos.

A.15. Análisis estadístico de los datos

Las diferencias entre datos con distribución normal fueron analizadas a través del test de t de Student. Los datos con distribución no normal, fueron comparados por el test no

paramétrico de Wilcoxon y el test de Friedman para comparaciones entre grupos múltiples. Los valores de $P < 0,05$ fueron considerados significativamente diferentes.

4. RESULTADOS

La literatura científica es coincidente en relación al efecto proinflamatorio que deviene de la activación de los RFcγ expresados por los granulocitos neutrófilos, inducida por los CI. Son muy numerosos los trabajos científicos publicados que ilustran este punto (1-10). Por el contrario, no hemos encontrado trabajos publicados relacionados a la capacidad de los CI de modular la apoptosis de los neutrófilos. Este aspecto adquiere relevancia cuando se considera el impacto que tiene en la resolución de los fenómenos inflamatorios agudos (100,101).

A efectos de encarar este estudio debe considerarse, en primer término, la heterogeneidad de los CI. De hecho, los CI constituyen un grupo heterogéneo de ligandos de los RFcγ que difieren, no sólo en su capacidad para activar distintas respuestas celulares, sino también en los mecanismos mediante los cuales inducen tal activación (7,187-191). Esta heterogeneidad esta dada, básicamente, por los siguientes factores: a) isotipo y afinidad del anticuerpo involucrado; b) naturaleza del antígeno (soluble o particulado); c) densidad de epitopes antigénicos; d) relación molar antígeno/anticuerpo, e) carga eléctrica del antígeno y/o anticuerpo y f) tamaño del CI.

Teniendo en cuenta estas observaciones decidimos analizar el impacto de los CI sobre la apoptosis de los neutrófilos utilizando para ello cuatro tipos distintos de CI: 1) CI solubles preparados con IgG humana u ovalbúmina, como antígenos y anticuerpos IgG de conejo específicos (CIs); 2) IgG humana agregada (IgGa), como análogo de CIs; 3) CI precipitantes preparados con IgG humana u ovalbúmina, como antígenos y anticuerpos IgG de conejo específicos (CIp) y 4) eritrocitos de ratón o carnero, sensibilizados con anticuerpos IgG de conejo específicos (E-IgG).

4.1. *Los CI modulan la apoptosis de los granulocitos neutrófilos*

La apoptosis de los neutrófilos se evaluó por dos metodologías: microscopía de fluorescencia, utilizando el colorante naranja de acridina y por citometría de flujo, empleando marcación con ioduro de propidio en solución hipotónica, de acuerdo a lo descripto en Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos (Figura 1) muestran que los diferentes CI empleados mediaron efectos opuestos sobre la apoptosis de los neutrófilos en cultivo. El tratamiento con CIs o IgGa fue capaz de prevenir significativamente la apoptosis, mientras que, por el contrario, los CIp y los E-IgG incrementaron los niveles porcentuales de apoptosis.

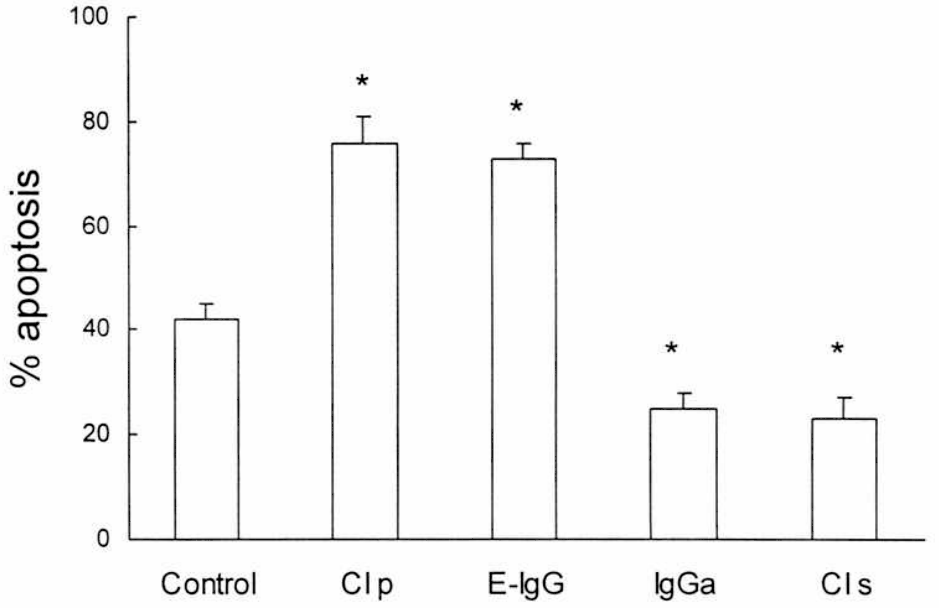


Figura 1: Modulación de la apoptosis de los neutrófilos por CI. Los neutrófilos (3 x 10^6/ml) se incubaron durante 18 hs a 37°C en presencia de CIp (20 μg/ml), E-IgG (1% v/v), IgGa (100 μg/ml) o CIs (100 μg/ml) o CIs (100 μg/ml). El porcentaje de células apoptóticas se determinó por microscopía de fluorescencia. Los resultados se expresan como la media aritmética ± ES de 9 experimentos.
* $p<0.01$, control vs tratados.

En forma simultánea se evaluó la viabilidad de las células controles y de aquellas incubadas con CIs o IgGa, por exclusión del colorante vital azul tripán y del colorante fluorescente bromuro de etidio. Se observaron, en todos los casos, porcentajes de viabilidad superiores al 94%. Por el contrario, los neutrófilos tratados con CIp o E-IgG mostraron niveles significativos de necrosis (rango 11-39%, n=17). Teniendo en cuenta que *in vitro*, las células apoptóticas desarrollan alteraciones necróticas a medida que progresa el cultivo, resultaba lógico suponer que los estudios realizados a las 18 hs de tratamiento subestimaran la potencialidad de

los CIp y los E-IgG, para promover la apoptosis. Se estudió, entonces, la apoptosis inducida por estos ligandos a tiempos más tempranos. Como se muestra en la Figura 2, tanto los CIp como los E-IgG indujeron un notorio incremento en los porcentuales de apoptosis, revelados luego de 8 y 12 horas de cultivo. A estos tiempos, la viabilidad celular no se vió afectada, siendo siempre mayor al 94%.

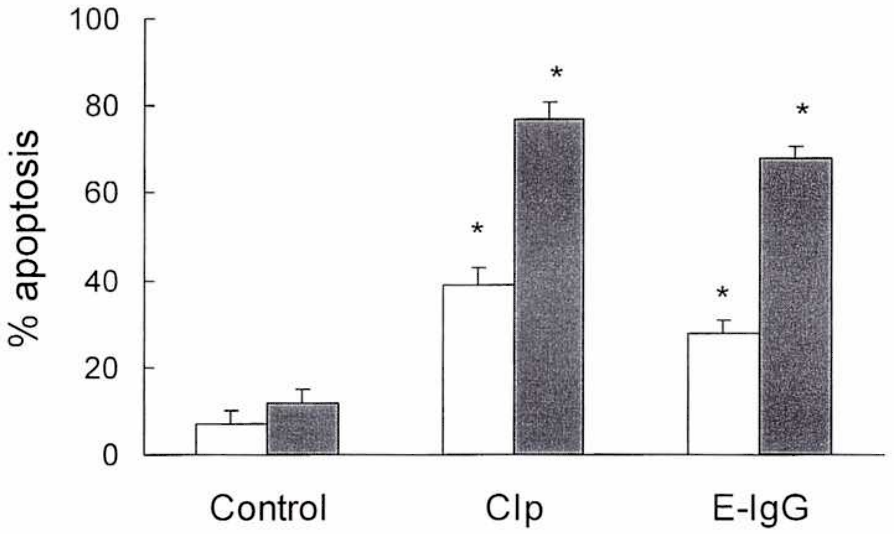


Figura 2: Estimulación de la apoptosis por CIp o E-IgG. Los neutrófilos se incubaron durante 8 hs (barras vacías) o 12 hs (barras llenas) con CIp o E-IgG. Los niveles de apoptosis se evaluaron por citometría de flujo. Los resultados se expresan como la media aritmética ± ES de 7 experimentos.
* $p<0.01$, control versus tratados.

A continuación se llevaron a cabo experimentos a fin de determinar las menores concentraciones de CIp y E-IgG requeridas para promover la apoptosis de los neutrófilos. Se observó (Figura 3) que concentraciones de CIp tan bajas como 1 ug/ml fueron capaces de incrementar significativamente los niveles de apoptosis. En cuanto a los E-IgG, se encontró estimulación de la apoptosis a concentraciones de 0,2% v/v.

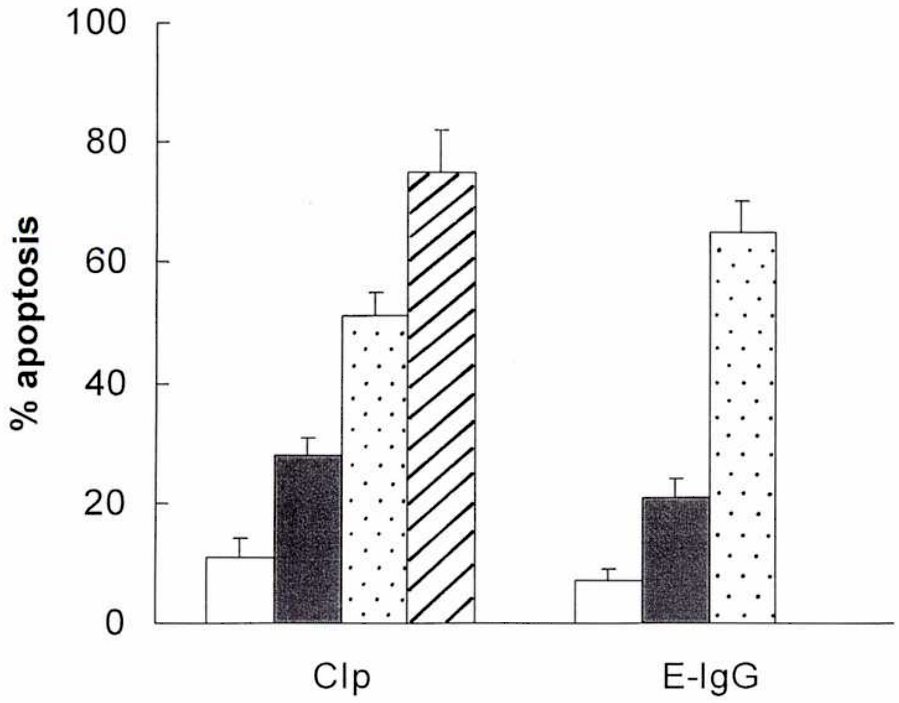


Figura 3: Estimulación de la apoptosis de neutrófilos por distintas concentraciones de CIp y E-IgG. Los neutrófilos se incubaron durante 12 hs con CIp: 1 μg/ml (barra oscura), 5 μg/ml (barra punteada) o 20 μg/ml (barra rayada) o E-IgG: 0,2% v/v (barra oscura) o 1% v/v (barra punteada). Las barras claras representan los niveles de apoptosis espontánea. La apoptosis se evaluó por microscopía de fluorescencia. Los resultados se expresan como la media aritmética ± ES de 3 experimentos.
* $p<0.01$, control versus tratados.

En la Figura 4 se muestra la morfología de las células controles y de las tratadas con CIp. En estas últimas se observa una disminución en el tamano celular y una marcada condensación cromatínica, propiedades características de las células apoptóticas.

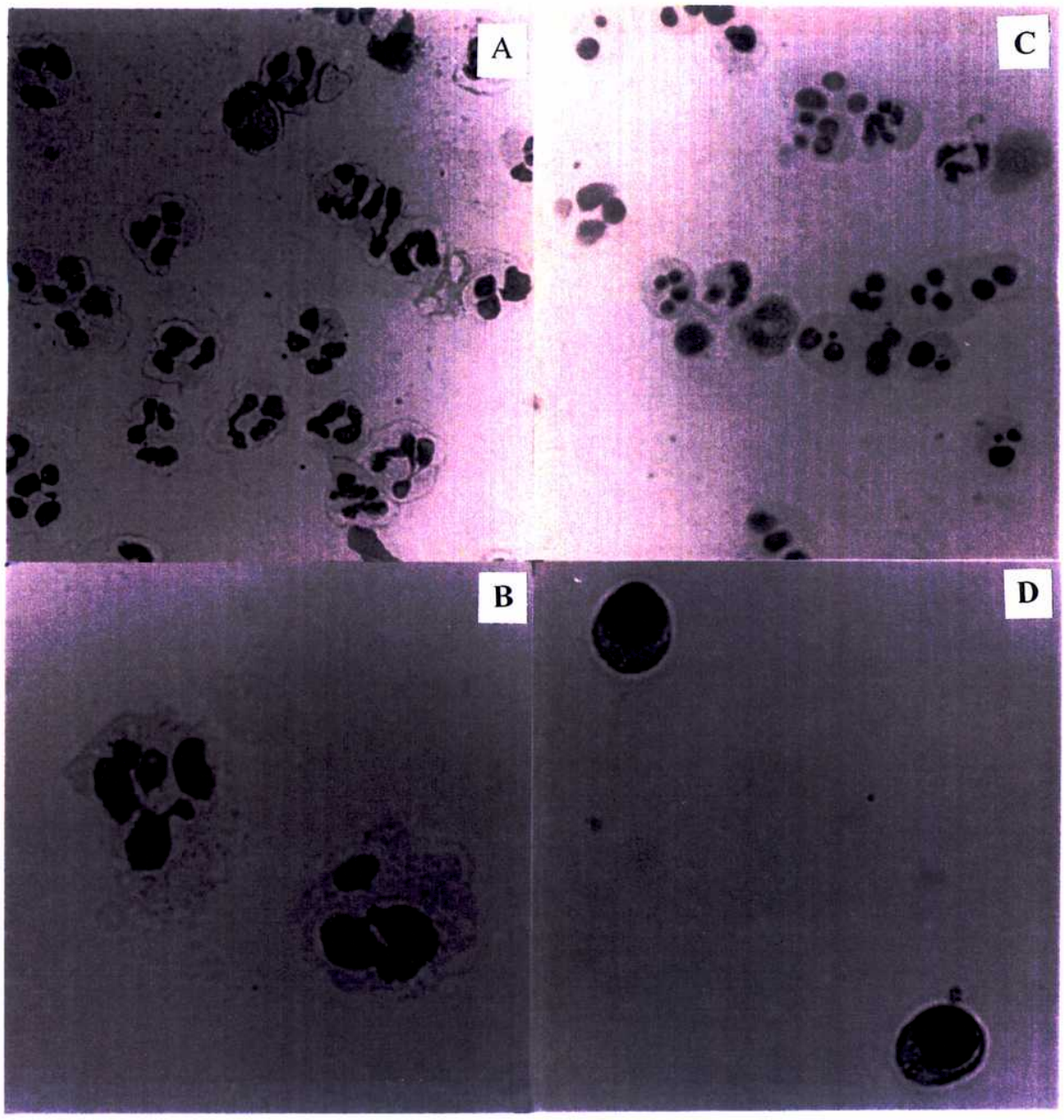


Figura 4: Apoptosis de neutrófilos inducida por Clp: morfología celular. Los neutrófilos se incubaron en ausencia (A y B) o presencia de (C y D) de Cl p (20 μg/ml) durante 12 hs a 37°C. Las células fueron fijadas con etanol 96°, coloreadas con May Grünwald-Giemsa y examinadas por microscopía óptica a 400x (A y C) y a 1000x (B y D).

El proceso de apoptosis cursa normalmente, no sólo con condensación crmatínica, sino también con fragmentación del material nuclear en forma de cuerpos apoptóticos, que en una

proporción variable son luego eliminados al medio extracelular. Ello permite la evaluación de la apoptosis por citometría de flujo, mediate la cuantificación del porcentaje de núcleos que presentan un contenido de ADN hipodiploide. En las Figuras 5 y 6 se muestran experimentos representativos del análisis por citometría de flujo de la apoptosis de neutrófilos tratados con IgGa o CIp.

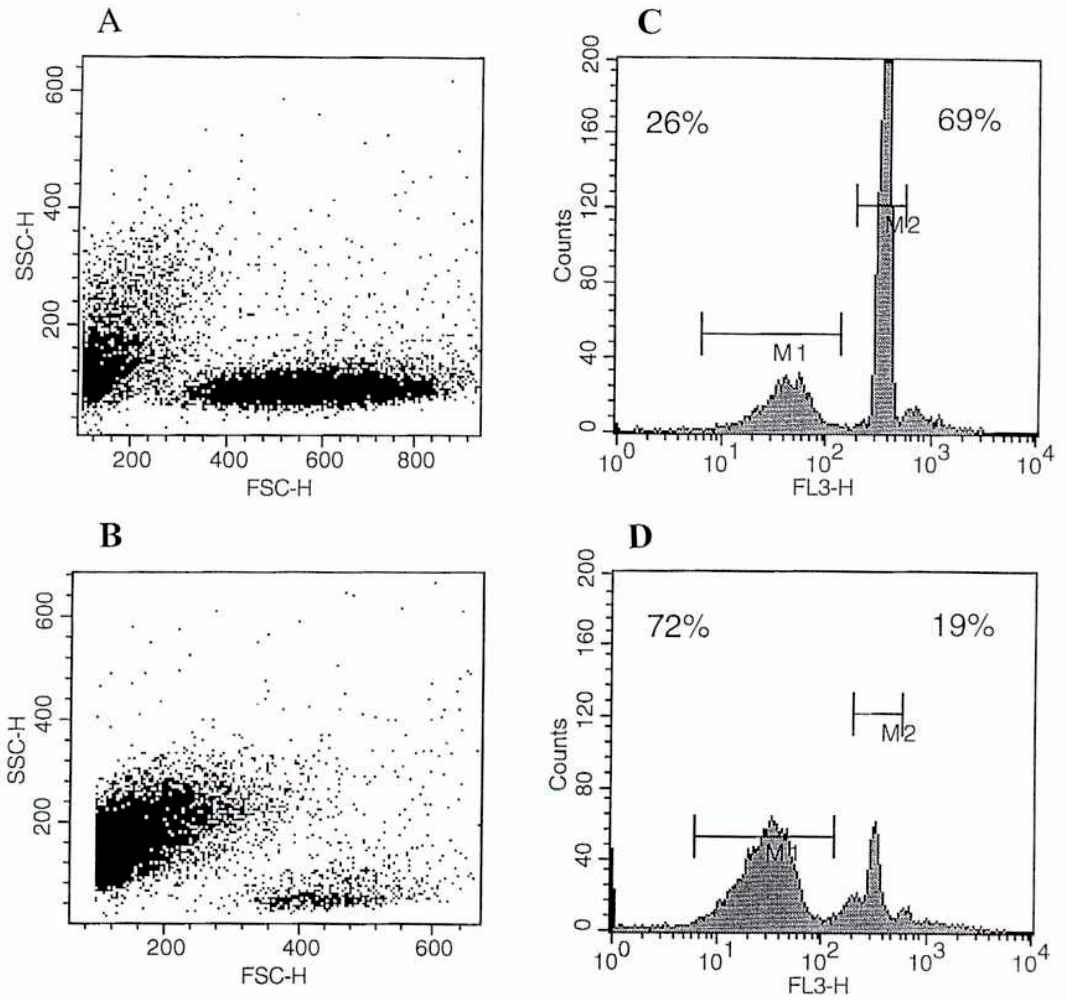


Figura 5: Apoptosis de neutrófilos inducida por CIp: análisis por citometría de flujo. En los gráficos de puntos se muetran los parámetros FSC ySSC, para núcleos provenientes de neutrófilos cultivados durante 12 hs a 37°C en ausencia (A) o presencia (B) de CIp (20 μg/ml) . Los histogramas de la derecha representan la fluorescencia emitida por núcleos de células no tratadas (C) o tratadas (D). M1 y M2 definen los porcentajes de núcleos hipodiploide y diploide respectivamente.

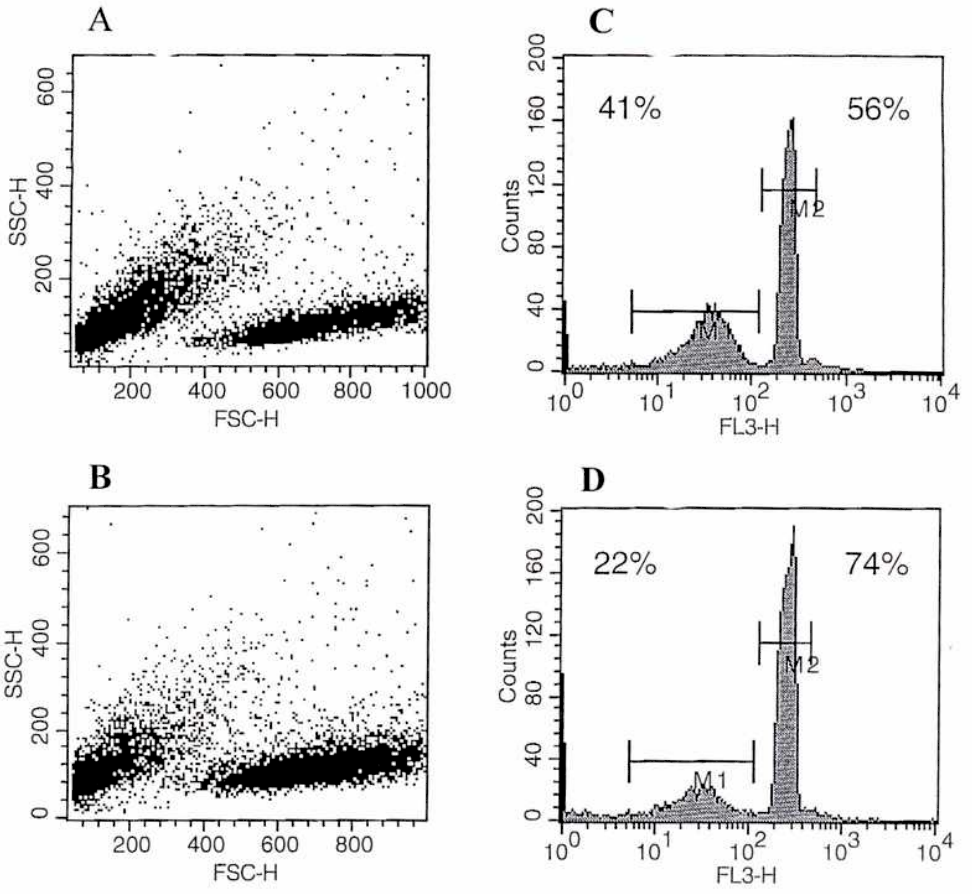


Figura 6: Apoptosis de neutrófilos inducida por IgGa: análisis por citometría de flujo. En los gráficos de puntos se muetran los parámetros FSC ySSC, para núcleos provenientes de neutrófilos cultivados durante 12 hs a 37°C en ausencia (A) o presencia (B) de CIp (20 μg/ml) . Los histogramas de la derecha representan la fluorescencia emitida por núcleos de células no tratadas (C) o tratadas (D). M1 y M2 definen los porcentajes de núcleos hipodiploide y diploide respectivamente.

Las técnicas preparativas empleadas habitualmente para la purificación de neutrófilos utilizan gradientes de Ficoll-Hypaque y lisis hipotónica de eritrocitos contaminantes. Se ha postulado que este tipo de metodología puede provocar la activación de los neutrófilos y/o alteraciones en la integridad de su membrana plasmática (192,193). Para descartar que los resultados obtenidos pudieran adjudicarse a la inducción de injuria celular o a la estimulación de los neutrófilos durante su purificación, se realizaron distintos experimentos con células obtenidas por sedimentación de la sangre entera en dextrán (ver Materiales y Métodos). De esta manera, se evitó la centrifugación sobre gradiente de Ficoll-Hypaque y la lisis hipotónica de los eritrocitos contaminantes. Las suspensiones obtenidas contuvieron células mononucleares (15-35%), neutrófilos (65-85%) y eritrocitos. Se encontró que la incubación de estas células durante 12 horas a 37° C con CIp o E-IgG indujo niveles de apoptosis similares a los observados con los neutrófilos purificados por las técnicas preparativas convencionales (% apoptosis: 6±3, 59±7 y 48±6 para neutrófilos controles, tratados con CIp y tratados con E-IgG respectivamente, n=5, $p<0.01$ controles vs tratados). No se observó apoptosis, por otra parte, al observar las células mononucleares (% apoptosis siempre menores al 4%).

4.2. *La estimulación de la apoptosis por CIp o E-IgG está mediada, fundamentalmente, a través del RFcγ IIa*

Los neutrófilos humanos expresan constitutivamente dos tipos de RFcγ: el RFcγ IIa y el RFcγ IIIb (4,7,8). A fin de examinar el papel que cumplen estos receptores en la estimulación de la apoptosis por CIp o E-IgG, se utilizaron anticuerpos monoclonales que bloquean en forma específica a los RFcγ IIa (Ac IV3) o a los RFcγ IIIb (Ac 3G8). Como se muestra en la Figura 7, el pretratamiento de los neutrófilos con el Ac IV3, pero no con el Ac 3G8, previno notoriamente la actividad estimulatoria de la apoptosis mediada tanto por CIp como por E-IgG. Ello sugiere que la promoción de la apoptosis involucra, básicamente, al RFcγIIa.

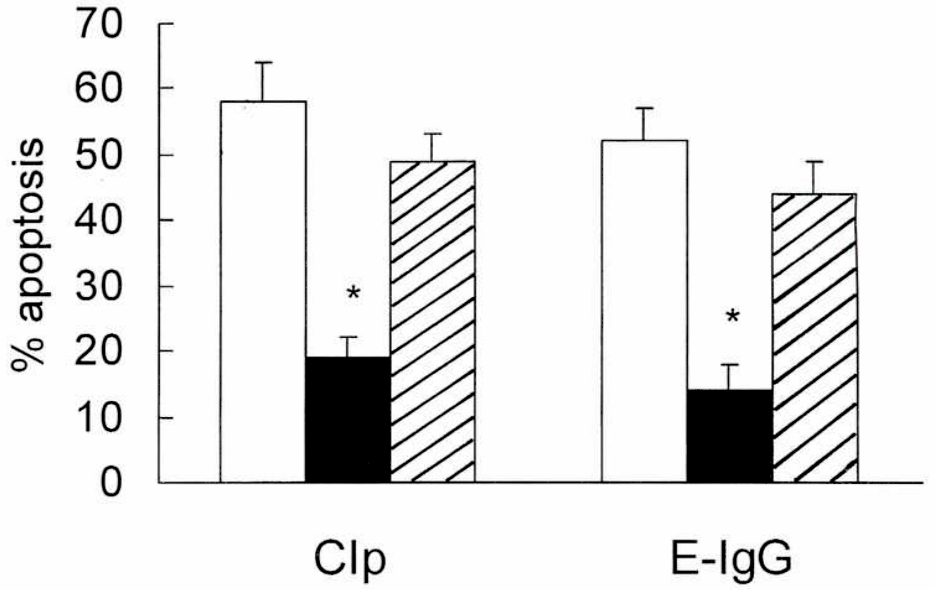


Figura 7: Papel de los RFcγ en la estimulación de la apoptosis de neutrófilos por CIp y E-IgG. Los neutrófilos se pretrataron durante 30 min a 4°C con los anticuerpos monoclonales IV3 (barras llenas) o 3G8 (barras rayadas). Luego, las células se incubaron durante 12 hs con CIp o E-IgG. Los niveles de apoptosis se evaluaron por microscopía de fluorescencia. Los resultados se expresan como la media aritmética ± ES de 4 experimentos.
* $p<0.01$, control versus tratados.

4.3. *La estimulación de la apoptosis por CIp o E-IgG no requiere de su internalización (fagocitosis)*

Los neutrófilos son capaces de internalizar los diferentes tipos de CI empleados en nuestro estudio. El mecanismo subyacente a su internalización difiere, no obstante, al comparar los CIs e IgGa, por una parte y los CIp y los E-IgG, por otra. Los primeros, por ser estímulos solubles, son pinocitados. Los segundos, por su naturaleza particulada, son fagocitados.

Se ha demostrado recientemente que la fagocitosis de bacterias por parte de los neutrófilos desencadena en éstos el proceso apoptótico (194,195). Considerando estas observaciones, se decidió investigar si la fagocitosis de los CIp y/o los E-IgG, constituía un requerimiento en relación a la estimulación de la apoptosis. A tal fin, se realizaron experimentos en presencia del agente disruptor de microfilamentos, citocalasina B (CB). Los resultados

apoptosisobtenidos (Figura 8) muestran que la CB, a concentraciones que resultan en una marcada inhibición de la fagocitosis de E-IgG (% inhibición de fagocitosis: 89±6, n=4), no afecta la estimulación de la apoptosis inducida por CIp o E-IgG.

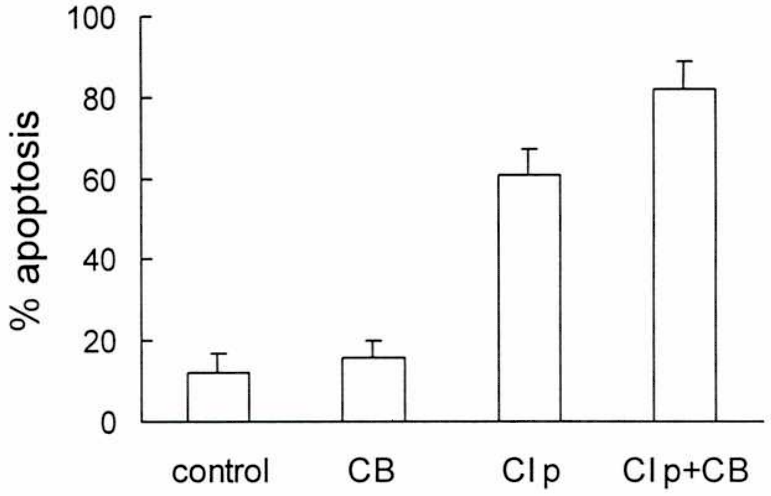


Figura 8: Efecto de la Citocalasina B sobre la estimulación de la apoptosis de neutrófilos inducida por CIp. Los neutrófilos se incubaron 30 min a 37°C con CB (2,5 μg/ml). Luego se añadieron los CIp (20 μg/ml), revelándose la apoptosis al cabo de 12 hs de incubación a 37°C. Los resultados se expresan como la media aritmética ± ES de 5 experimentos.

4.4. *La promoción de la apoptosis por CIp o E-IgG no involucra el sistema fas/fasL*

Tal como ya ha sido mencionado, numerosas evidencias indican que el sistema fas/fas ligando (fasL) cumple un papel crítico en la inducción de apoptosis de diversos tipos celulares (156,157). Teniendo en cuenta que los neutrófilos humanos expresan tanto fas como fas L (178), analizamos a continuación si la acción promotora de la apoptosis mediada por CIp y E-IgG, involucraba un incremento en la expresión y/o actividad del sistema fas/fasL del neutrófilo. A fin de cuantificar la expresión de fas y fasL se emplearon los AcM CH-11, dirigido contra la molécula de fas y G247-4, dirigido contra FasL. La expresión superficial de ambas moléculas se evaluó luego de 3 hs de incubación con CIp. No se encontraron diferencias significativas entre neutrófilos controles y tratados (Figura 9). Resultados similares se observaron al analizar la expresión de fas y fasL en neutrófilos tratados con E-IgG (datos no mostrados).

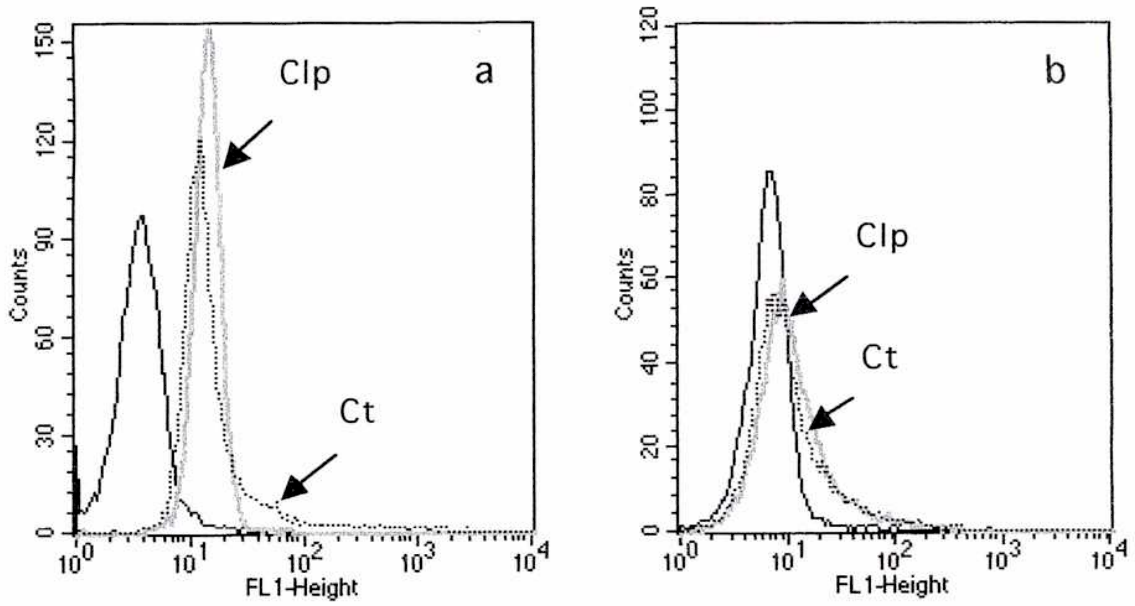


Figura 9: Expresión de fas y fasL en neutrófilos tratados con CIp. Los neutrófilos fueron tratados con CIp (20 μg/ml) durante 3 hs a 37°C. Luego, la expresión de fas (a) y fasL (b) se evaluó mediante anticuerpos monoclonales específicos y citometría de flujo. Los gráficos muestran un experimento representativo de 4 realizados.

La falta de participación del sistema fas/fasL en la actividad promotora de la apoptosis mediada por CIp y E-IgG fue confirmada mediante el empleo de un AcM bloqueante dirigido hacia la molécula de fasL (NOK-1). El tratamiento de los neutrófilos con este anticuerpo no previno la acción mediada por CIp y E-IgG (Figura 10).

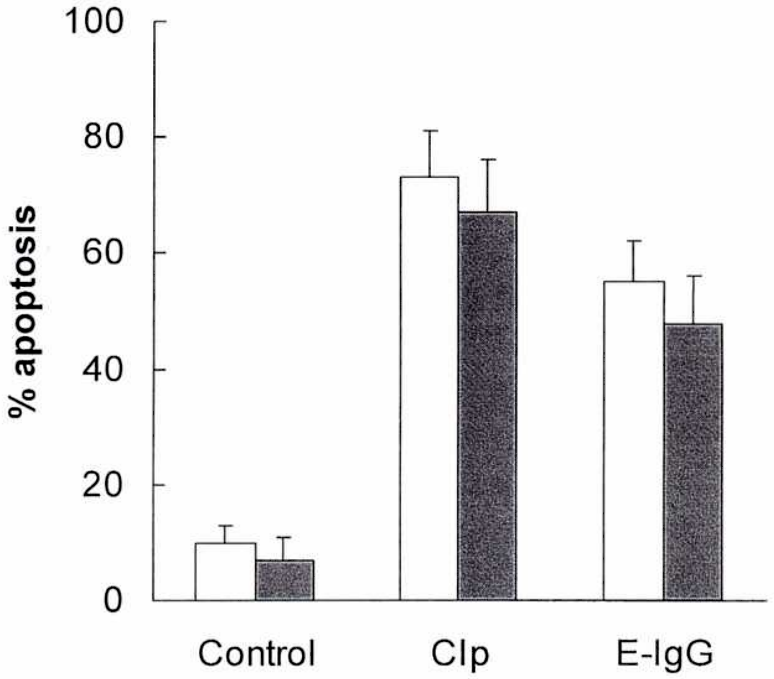


Figura 10: Efecto de anticuerpos bloqueantes anti-fasL sobre la estimulación de la apoptosis de neutrófilos inducida por CIp y E-IgG. Los neutrófilos fueron tratados con el anticuerpo bloqueante anti-fasL (NOK-1) durante 30 min a 37°C. Luego, se añadieron los CIp (20 µg/ml) y los E-IgG (1% v/v), evaluándose la apoptosis luego de 12 hs de cultivo. Los resultados se expresan como la media aritmética ± ES de 4 experimentos.

4.5. *Análisis comparativo del patrón de activación inducido en el neutrófilo por IgGa y CIp*

Los efectos opuestos inducidos por la IgGa y los CIp sobre la apoptosis de los neutrófilos podrían estar relacionados, al menos en parte, a la capacidad diferencial de estos ligandos para inducir respuestas específicas en el neutrófilo. Para investigar este punto, se analizó en primer lugar su capacidad para inducir la movilización de Ca^{2+} intracelular, una respuesta que ha sido asociada a la prevención de la apoptosis en el neutrófilo (196). Como se muestra en la Figura 11, la IgGa y los CIp mediaron incrementos comparables en los niveles de Ca^{2+}.

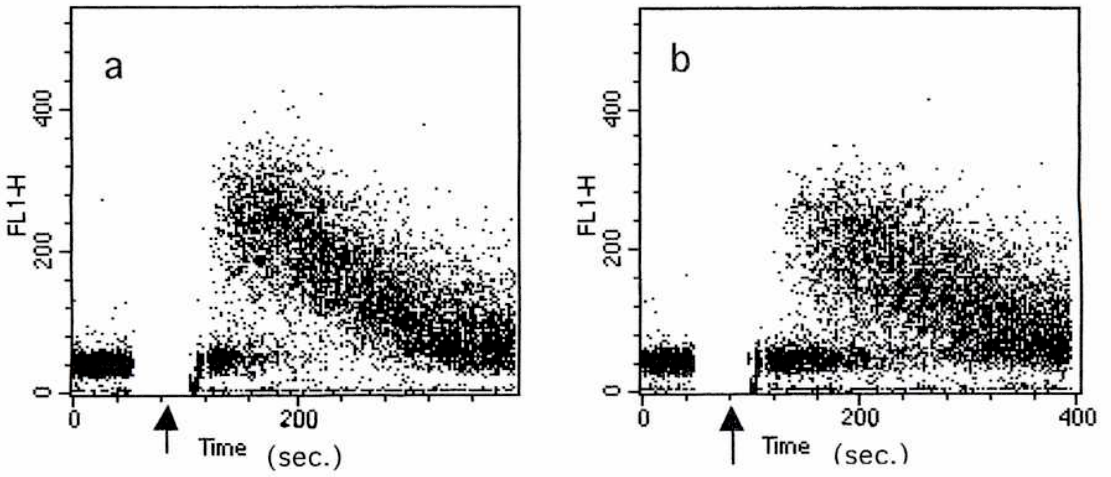


Figura 11: Fluctuaciones en la concentración intracelular de Ca^{2+} inducidas por IgGa y CIp. Los ensayos se realizaron por citometría de flujo empleando Fluo 3-AM, de acuerdo a lo descripto en Materiales y Métodos. Las flechas indican el momento en el cual se agregan la IgGa (a) o los CIp (b). Los gráficos muestran los resultados de un experimento representativo de 8 realizados.

La activación de los neutrófilos conduce, en forma temprana, a dos manifestaciones: a) cambio de forma y b) incremento en la expresión de CD18. A continuación, se analizó, en forma comparativa, la capacidad de la IgGa y los CIp para inducir ambas respuestas. Como se observa en las Figuras 12 y 13, los dos estímulos indujeron alteraciones significativas en ambos parámetros de activación. No obstante, las respuestas inducidas por los CIp fueron superiores a las inducidas por IgGa.

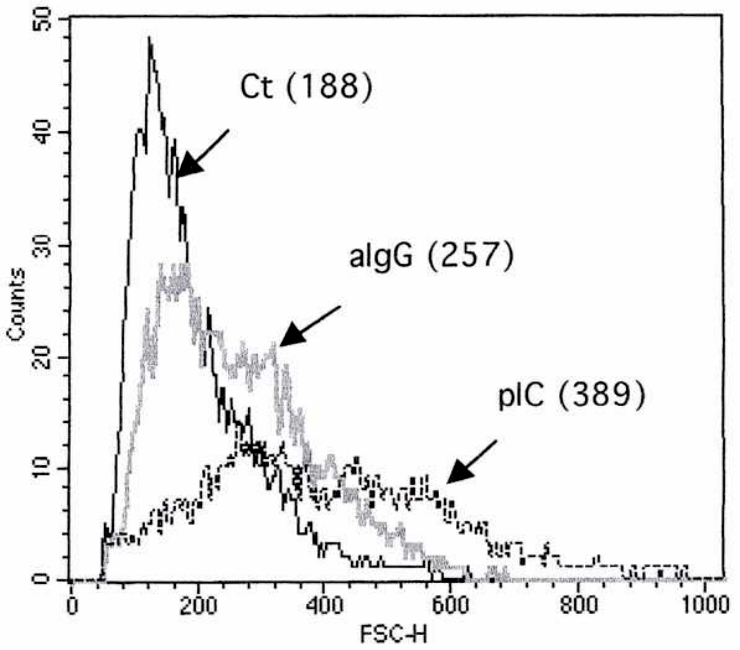


Figura 12: Cambio de forma inducido por IgGa y CIp. Los neutrófilos fueron estimulados por IgGa (100 μg/ml) o CIp (20 μg/ml) durante 30 min a 37°C, luego se fijaron, evaluándose el tamaño celular (FSC) por citometría de flujo. Entre paréntesis se indican los valores medios de tamaño, en unidades relativas de FSC. Los gráficos muestran los resultados obtenidos en un experimento representativo de 5 realizados.

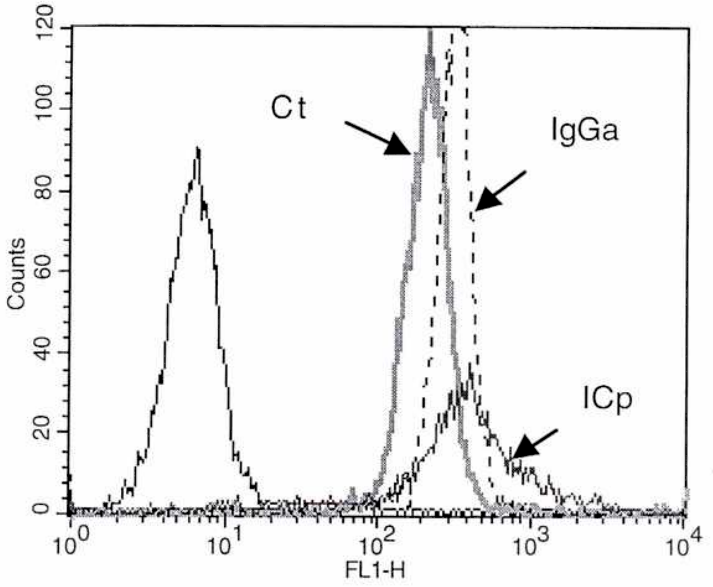


Figura 13: Incremento en la expresión de CD18 inducido por IgGa y CIp. Los neutrófilos fueron estimulados por IgGa (100 μg/ml) o CIp (20 μg/ml) durante 15 min a 37°C. Las células fueron luego fijadas, evaluándose la expresión de CD18 mediante anticuerpos específicos y citometría de flujo. Los gráficos muestran los resultados obtenidos en un experimento representativo de 5 realizados.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que la presencia de serino-proteasas en el medio extracelular promovía, en forma notoria, la apoptosis de los neutrófilos (197). Considerando que los gránulos de los neutrófilos contienen diversas serino-proteasas, las cuales podrían ser liberadas al medio extracelular si el neutrófilo se degranulara investigamos, en forma comparativa, la capacidad de la IgGa y los CIp de inducir la degranulación de los neutrófilos, a través de la determinación de MPO en el medio extracelular. En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos. Sólo los CIp indujeron niveles significativos de liberación de MPO.

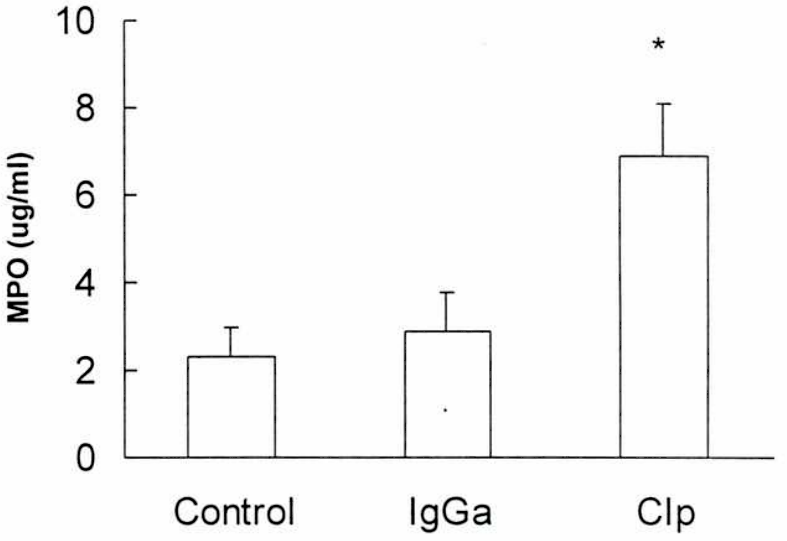


Figura 14: Liberación de mieloperoxidasa (MPO) por neutrófilos estimulados por IgGa o CIp. Los neutrófilos fueron tratados con IgGa (100 μg/ml) o CIp (20 μg/ml) durante 15 min a 37°C. La presencia de MPO en el medio extracelular, fue luego evaluada de acuerdo a lo descripto en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media ± ES de 5 experimentos.
*$p<0.05$ control vs CIp

Numerosas evidencias sugieren que el estrés oxidativo juega un papel fundamental en la inducción de apoptosis de diferentes tipos celulares, incluyendo los neutrófilos (198-202). Muchos de los agentes capaces de estimular la apoptosis son moléculas oxidantes o inductores del metabolismo oxidativo celular. Por su parte, muchos inhibidores de la apoptosis tienen actividad antioxidante o incrementan las defensas antioxidantes celulares (198-202). Tomando en cuenta estas observaciones estudiamos, en forma comparativa, la capacidad de la IgGa y los

CIp para estimular el estallido respiratorio, medido como emisión de quimioluminiscencia (CL). Los resultados obtenidos muestran que la respuesta de CL inducida por los CIp fue aproximadamente veinte veces mayor respecto de la inducida por IgGa (Figura 15).

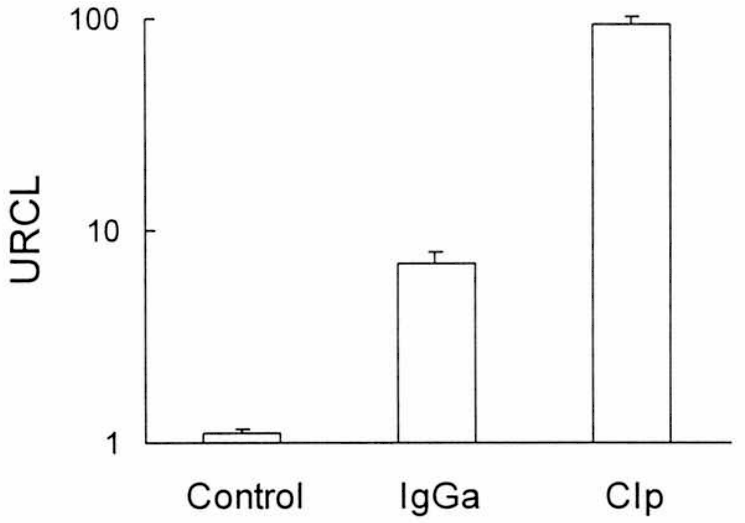


Figura 15: Inducción de quimioluminiscencia (CL) en neutrófilos por IgGa o CIp. Los neutrófilos fueron estimulados por IgGa (100 μg/ml) o CIp (20 μg/ml) evaluándose la emisión de luz en forma continua durante 10 min. Los resultados expresan los valores máximos de CL observados durante este periodo y representan la media ± ES de 6 experimentos.

La cinética de la respuesta CL mostró, también, diferencias de notable envergadura. Mientras que la emisión de luz inducida por IgGa declinó a niveles basales a los tres minutos posteriores a la estimulación, la inducida por CIp permaneció en sus niveles máximos al menos durante dos horas (Tabla 1). En otra serie de experimentos se compararon las respuestas de CL inducida por CIs o E-IgG. Como se muestra en la Tabla 1, la respuesta inducida por CIs desciende a valores basales 5 minutos después de la estimulación. En contraste, aquella inducida por E-IgG (1% v/v) se caracteriza por presentar altos niveles de QL, los que retornan a los valores basales a los 50 minutos post-estimulación.

Tabla 1

Tratamiento	Quimioluminiscencia (URCL) a los				
	2 min	5 min	30 min	60 min	120 min
IgGa	9±2	1±0,5	-	-	-
CIs	6±2	1±0,5	-	-	-
CIp	94±6	90±7	92±5	93±8	89±8
E-IgG	47±5	45±7	21±4	1±0,5	-

4.6. *Efecto de inhibidores de serino-proteasas y agentes secuestradores de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) sobre la estimulación de la apoptosis de los neutrófilos inducida por CIp*

Considerando la mayor capacidad de los CIp, respecto de la IgGa, para inducir la degranulación de los neutrófilos, analizamos la posible participación de serino proteasas en la estimulación de la apoptosis de los neutrófilos por CIp. A tal fin, empleamos dos inhibidores de serino-proteasas: aprotinina y un inhibidor de tripsina/quimiotripsina (197). El papel de los IRO, por otra parte, se examinó mediante el empleo de catalasa y superóxido dismutasa (SOD). Los resultados obtenidos (Figura 16) muestran que entre los agentes empleados sólo la catalasa fue capaz de prevenir la estimulación de la apoptosis inducida por CIp,. Ello sugiere que el H_2O_2 juega un papel relevante en este fenómeno. Resultados similares se observaron al examinar el mismo panel de agentes sobre la estimulación de la apoptosis inducida por E-IgG. Sólo la

catalasa medió un efecto inhibitorio (% apoptosis: 64±7 y 31±5, n=4, para neutrófilos incubados durante 12 hs en ausencia o presencia de catalasa 5.000 U/ml).

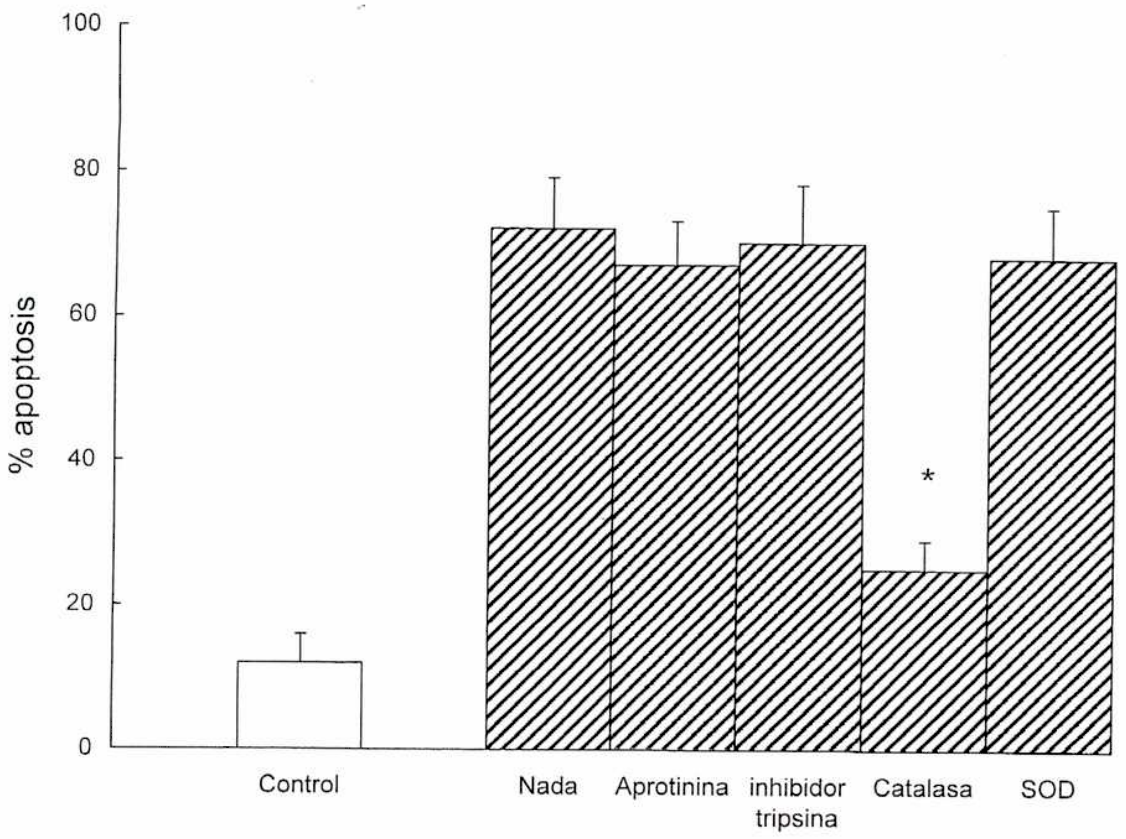


Figura 16: Efecto de inhibidores de serino-proteasas y agentes secuestradores de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) sobre la estimulación de la apoptosis de los neutrófilos inducida por CIp. Los neutrófilos se incubaron con CIp en presencia de aprotinina (2.500 U/ml), inhibidor de tripsina/quimotripsina (soybean) (50 μg/ml), catalasa (5.000 U/ml) o superóxido dismutasa (5.000 U/ml) (barras rayadas), revelándose la apoptosis luego de 12 hs de incubación. Los resultados representan la media ± ES de 6 experimentos.
* $p<0.05$ CIp vs CIp + catalasa.

Estudios previous demostraron que, al inhibir a la catalase y mieloperoxidasa endógenas por tratamiento con inhibidores de hemo-enzimas, se observa un marcado incremento tanto en el consumo de O_2 como en la liberación de H_2O_2 que acompañan a la activación del neutrófilo (203,204). Considerando estas observaciones, resultaría lógico suponer que la inhibición de la catalasa y mieloperoxidasa endógenas potenciaría el efecto promotor de la apoptosis inducido por CIp y E-IgG. A tal efecto, empleamos azida sódica (0,1 mM), un inhibidor de hemo-enzimas.

Como se observa en la Figura 16, la azida sódica no afectó la apoptosis espontánea de los neutrófilos, evaluada tanto a las 12 como a las 18 hs de cultivo. En contraste, en los neutrófilos estimulados con CIp o E-IgG, la azida sódica indujo un dramático incremento de los niveles de apoptosis. Debe enfatizarse que la cuantificación de la apoptosis se llevó a cabo a las 3 hs de cultivo ya que, a tiempos posteriores se observaron niveles crecientes de células apoptóticas con alteraciones necróticas, en aquellos cultivos realizados en presencia de azida.

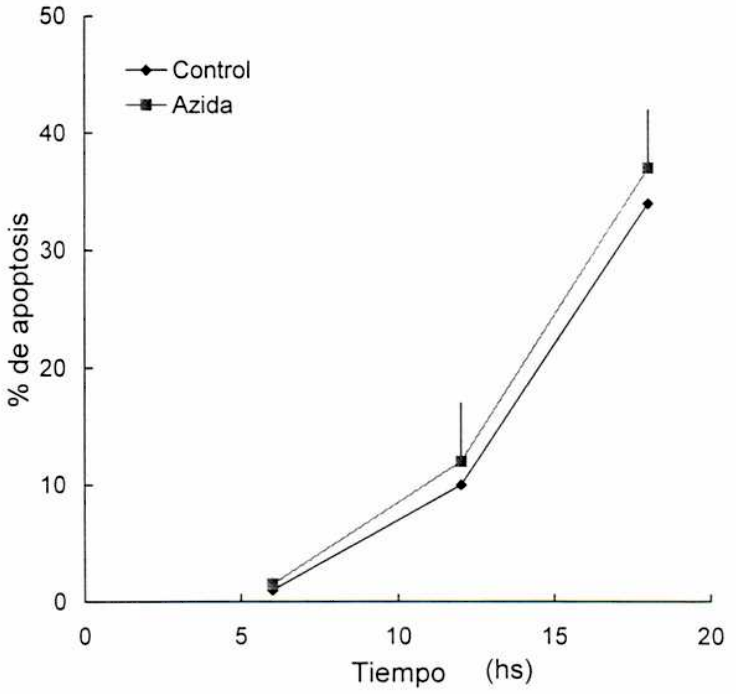


Figura 16: Efecto de la azida sódica sobre la apoptosis espontánea de neutrófilos. Los neutrófilos fueron incubados en presencia de azida sódica 0,1 mM, revelándose la apoptosis por microscopía de fluorescencia, en los tiempos indicados. Los resultados representan la media ± ES de 5 experimentos.

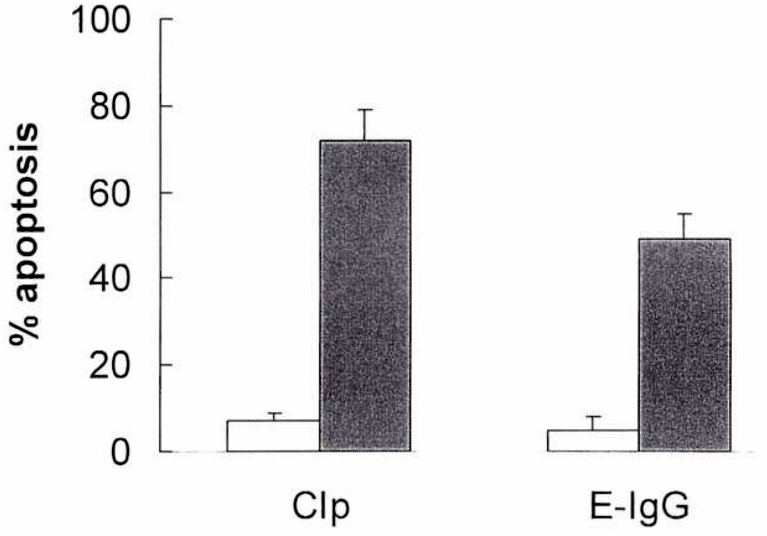


Figura 17: Efecto de la azida sódica sobre la apoptosis de neutrófilos inducida por CIp y E-IgG. Los neutrófilos fueron incubados con CIp o E-IgG, en ausencia (barras vacías) o presencoa de azida sódica 0,1 mM (barras rellenas), revelándose la apoptosis por microscopía de fluorescencia, a las 3 hs. Los resultados representan la media ± ES de 6 experimentos.

4.7. *Efecto de IgGa, CIp e E-IgG sobre la apoptosis de neutrófilos provenientes de un paciente con enfermedad granulomatosa crónica (CGD)*

La granulomatosis crónica es un desorden hereditario poco frecuente que se caracteriza por la disminución o ausencia de producción de anión debido a un defecto en alguno de los componentes de la NADPH oxidasa (36,37). Para determinar si la producción de IRO era responsable de la estimulación de la apoptosis de los neutrófilos inducida por CIp o E-IgG, se examinó su efecto sobre neutrófilos aislados a partir de un paciente con CGD. Cabe señalar que los neutrófilos aislados de este paciente produjeron, en respuesta a fMLP, CIp y zimosán, niveles de anión superóxido menores del 5% respecto de las células normales (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos (Figura 19) muestran que, a diferencia de lo observado en los neutrófilos normales, los CIp y los E-IgG no promovieron la apoptosis de los neutrófilos. Por el contrario, para los E-IgG se observó una moderada acción inhibitoria.

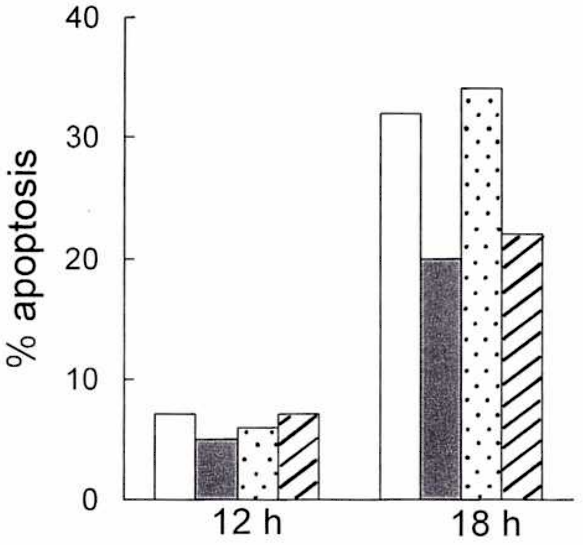


Figura 19: Efecto de IgGa, CIp y E-IgG sobre la apoptosis de neutrófilos CGD. Los neutrófilos fueron incubados con IgGa (100 μg/ml) (barras oscuras), CIp (20 μg/ml) (barra punteadas) o E-IgG (1% v/v) (barras rayadas) durante los tiempos indicados en la figura. Los resultados representan un experimento realizado.

5. DISCUSION

Los resultados que se presentan en este seminario demuestran que los CI formados por anticuerpos de isotipo IgG son capaces de modular la apoptosis de los neutrófilos de manera diferente según se trate de CI solubles o particulados. Es así que, mientras los CIp y los E-IgG promovieron en forma notoria la apoptosis, los CIs y la IgGa, la inhibieron significativamente.

El interés de nuestras observaciones puede explicarse, básicamente, en función de tres consideraciones.

1) La apoptosis juega un papel fundamental en la resolución de los fenómenos inflamatorios agudos (96,100,101). Los neutrófilos apoptóticos, a diferencia de los necróticos, no liberan su contenido autotóxico en el seno del tejido inflamado (169,173). Por otra parte, los neutrófilos apoptóticos, pero no los necróticos, son rápidamente removidos del foco inflamatorio por fagocitos, profesionales o no, a través de un proceso que no involucra la liberación de mediadores inflamatorios (132,137). La capacidad de los CI de promover la apoptosis del neutrófilo, debe entenderse, por lo tanto, como una acción de claro contenido anti-inflamatorio.
2) La asociación de neutrófilos y CI no es arbitraria. Por el contrario, las interacciones establecidos entre ambos juegan un papel fundamental en la etiopatogénesis de numerosas enfermedades de naturaleza autoinmune (glomerulonefritis, vasculitis y artritis) y/o infecciosa (hepatitis e infecciones estreptocóccicas) (1-4). Por otra parte, debe considerarse que los neutrófilos constituyen el infiltrado leucocitario primario en procesos inflamatorios agudos, de etiología infecciosa, neoplásica y/o autoinmune (28,38,39). Estos procesos suelen cursar con presencia de altos niveles de CI (1,3).
3) En los procesos inflamatorios, los neutrófilos pueden ser activados por un amplio conjunto de agentes: péptidos quimiotácticos formilados, anafilotoxinas derivadas de la activación del sistema complemento (C5a y C3a), el leucotrieno B4 (LB4), los factores de estimulación de la formación de colonias para granulocitos (G-CSF) o granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el interferón-γ, etc. Estos agentes, no sólo activan a los neutrófilos sino que además, suelen prevenir su apoptosis, mediando de este modo una doble acción de naturaleza proinflamatoria (169,172,173,175-177). En este sentido, la capacidad que presentan los CIp y los E-IgG de inducir la activación de los neutrófilos, promoviendo posteriormente su apoptosis, representa

una cualidad distintiva, de sumo interés.

El patrón heterogéneo de respuesta inducido por diferentes tipos de CI es un aspecto clave de nuestros resultados. Las razones subyacentes a estas diferencias no han sido aún investigadas. No obstante, conviene detenerse un instante en el concepto relativo a heterogeneidad de los CI.

Trabajos previos desarrollados en diferentes laboratorios han demostrado también una funcionalidad disímil para diferentes tipos de CI que contengan anticuerpos IgG. Estudios desarrollados por Zhang y colaboradores (205), en los que se usaron CI preparados con diferentes isotipos de IgG humana, mostraron que aquellos formados con IgG1, IgG2 e IgG4, pero no con IgG3, eran capaces de inducir la activación del estallido respiratorio de neutrófilos. Por el contrario, los CI preparados con IgG3 fueron los que presentaron mayor capacidad para estimular la liberación de enzimas lisosomales. La capacidad para inducir el estallido respiratorio de los CI preparados con IgG1, IgG2 e IgG4 mostró, por otra parte, dependencia de la relación molar antígeno/anticuerpo. Así, los preparados en exceso de anticuerpo mostraron mayor actividad respecto de los preparados en equivalencia, mientras que los formados en exceso de antígeno fueron los menos activos. Los mismos autores demostraron, por último, que la densidad de epitopes expresados por el antígeno condiciona, críticamente, la capacidad de los CI de inducir tanto el estallido respiratorio como la degranulación de los neutrófilos (205).

Estudios desarrollados por Crockett-Torabi y Fantone en neutrófilos humanos (206), demostraron que los CI precipitantes y los CI solubles inducen la activación del estallido respiratorio por diferentes mecanismos. Los autores observaron que la citocalasina B, un agente disruptor de microfilamentos, potencia la producción de O_2^- inducida por CI solubles pero no afecta la inducida por CI precipitantes. El tratamiento con prostaglandina E1 o con la toxina de *Pertrusis*, por otra parte, fue capaz de inhibir la producción de O_2^- inducida por CI solubles sin afectar la producción inducida por CI precipitantes. Al analizar, por último, el receptor responsable de la activación del estallido respiratorio los autores encontraron que, en el caso de los CI precipitantes, se halla involucrado, básicamente, el RFcγIII, mientras que para los CI solubles se involucran tanto el RFcγII como el RFcγIII (206). Estos resultados ponen de manifiesto, por una parte, que las características del CI condicionan el tipo de RFcγ involucrado en la activación celular y, por otra, que diferentes RFcγ son capaces de mediar una misma respuesta biológica. Son numerosos los trabajos que ilustran este último aspecto. Tanto el RFcγII como el RFcγIII pueden mediar la activación del estallido respiratorio y la liberación de enzimas

lisosomales por parte de neutrófilos humanos (5,207,208). Se realizaron hallazgos similares al analizar otras respuestas funcionales como la fagocitosis de células sensibilizadas por anticuerpos (209) o la CCDA mediada por monocitos y neutrófilos contra líneas celulares de hibridoma que expresan en su superficie AcM específicos para cada uno de los RFcγ. Tanto el RFcγI, como el RFcγII y el RFcγIIIa fueron capaces de mediar la lisis de las células *blanco* (210).

Estudios realizados en nuestro laboratorio empleando neutrófilos y monocitos humanos han demostrado, por otra parte, que la forma particular en la que un CI presenta los anticuerpos a los RFcγ condiciona la naturaleza de las respuestas citotóxicas que ellos inducen. Estos trabajos, desarrollados entre los años 1986 y 1988, demostraron que la estimulación de células fagocíticas por CIp, conduce a la destrucción de células *blanco* no sensibilizadas por anticuerpos (citotoxicidad inespecífica-CIN) (211-214). A diferencia de la CCDA, donde el anticuerpo IgG inductor se encuentra recubriendo a la célula *blanco*, en la CIN, los anticuerpos IgG foman parte de CIp no relacionados con la célula *blanco*. Ambos mecanismos citotóxicos difirieron marcadamente en los siguientes aspectos: *(1)* los mecanismos efectores citolíticos, *(2)* la naturaleza de las vías transduccionales involucradas en su inducción, *(3)* su susceptibilidad a ser modulados por acción del interferón γ y *(4)* los tipos de RFcγ que participan en su inducción. Estas diferencias no pudieron ser atribuidas a propiedades particulares de los anticuerpos IgG, dado que todas las subclases de IgG humana fueron capaces de inducir ambos mecanismos citotóxicos (215). Más aún, tanto la CCDA como la CIN pudieron inducirse utilizando un mismo anticuerpo monoclonal de origen murino. La primera, al presentarse el anticuerpo sobre la superficie de los eritrocitos empleados como *blancos* de la reacción. La segunda, al presentarse el anticuerpo bajo la forma de CI precipitante (Geffner, J., resultados no publicados).

Las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los CI son determinadas, en última instancia, por las características de los anticuerpos y antígenos que los integran y por las propiedades del entorno en el cual se produce la interacción antígeno/anticuerpo. Las propiedades del entorno guardan relación con diversos factores: presencia de otras proteínas, actividad del sistema complemento, fuerza iónica y pH, entre otros (1,85,86). Los experimentos desarrollados en el presente seminario se llevaron a cabo íntegramente *in vitro*. Por lo tanto, el análisis de los factores que determinan la variabilidad de los CI puede obviar las propiedades del microambiente en donde

se produce el reconocimiento antigénico, ya que para los diferentes tipos de CI empleados este microambiente fue idéntico.

Una primera aproximación a las propiedades del antígeno debe incluir: su naturaleza soluble o particulada, su tamaño, la densidad de epitopes antigénicos y su carga eléctrica. Por parte de los anticuerpos, debe considerarse: la especie animal de origen, su isotipo, su afinidad y su carga eléctrica. Las propiedades del CI variarán, además, de acuerdo a la relación molar antígeno/anticuerpo y a las concentraciones absolutas de antígeno y anticuerpo (1,85,86).

Los CI empleados en nuestros estudios difieren en numerosas propiedades, cada una de las cuales podría ser objeto de estudio. En nuestra opinión, no obstante, el análisis de aquellas propiedades que determinan la capacidad de un CI de estimular o prevenir la apoptosis, debería comenzar por un aspecto particular: el tamaño del CI. Los CI que mediaron una acción preventiva sobre la apoptosis (CIs e IgGa) son CI pequeños. Análisis previos realizados por nuestro grupo de trabajo, mediante técnicas de ultracentrifugación en gradientes de sacarosa, indicaron que tanto los CIs como la IgGa comprometen entre 2 a 4 moléculas de anticuerpo por cada entidad (216). Por el contrario, tanto los CIp como los E-IgG, constituyen CI de gran tamaño, los cuales comprometen en el caso de los CIp, extensas redes antígeno/anticuerpo y en el caso de los E-IgG, enormes cantidades de anticuerpos unidos a una extensa superficie.

Es importante destacar que las diferentes propiedades agonistas de los CIs y la IgGa, en relación a aquellas presentes en los CIp y los E-IgG, se evidenciaron sólo en ciertas respuestas: modulación de la apoptosis, producción de quimioluminiscencia y liberación de mieloperoxidasa. No obstante, otras respuestas fueron inducidas en forma similar por los diferentes CI: incremento en las concentraciones citoplasmáticas de Ca^{2+} e inducción de adherencia a superficies recubiertas con proteínas (resultados no mostrados).

Las diferentes propiedades funcionales de los CI podrían relacionarse con su capacidad para inducir distintos patrones de microagregación de los RFcγ. En este sentido, defe enfatizarse que, si bien es ampliamente aceptado que el fenómeno subyacente a la activación de los RFcγ reside en la microagregación de los mismos sobre la superficie celular (4-11), no ha sido aún establecido de que modo la inducción de diferentes patrones de microagregación se relacionaría con la activación de particulares vías transduccionales y/o la puesta en marcha de diferentes respuestas celulares.

La interacción de los CI formados por anticuerpos IgG con los RFcγ expresados por leucocitos es capaz de mediar la transducción de señales que conducen a la activación celular, para

el caso de los RFcγ que expresan motivos ITAM o a la inhibición celular, para el caso de los RFcγ que expresan motivos ITIM (8-10). Trabajos desarrollados en el año 1996, en células *natural killer* (células NK), mostraron además que los RFcγ son capaces también de modular el ciclo de vida celular. Observaciones realizadas en forma independiente por dos laboratorios (217,218) mostraron, en células NK activadas por IL-2, que la activación del RFcγIIIa por CI induce la apoptosis celular a través de un mecanismo que involucra una expresión aumentada del oncogen *c-myc*. Observaciones realizadas en uno de los dos laboratorios mostraron, por otra parte, que no todos los CI eran capaces de mediar la apoptosis de las células NK activadas. Mientras que la IgG agregada y anticuerpos monoclonales anti-CD16 (RFcγIII) promovieron notoriamente la apoptosis, al emplear células *blanco* recubiertas con anticuerpos IgG, como modelo de CI, no se observó efecto alguno (217). Estos resultados ilustran, por otra parte, un concepto desarrollado previamente: el comportamiento heterógeneo de diferentes CI. Merece destacarse, por último, que estos resultados contrastan con nuestras observaciones hechas en neutrófilos humanos y aquellas realizadas en células NK. Así, la IgG agregada indujo la apoptosis de células NK (217), pero previno la apoptosis de neutrófilos. Las células *blanco* recubiertas con anticuerpos (E-IgG en nuestro sistema) no evidenciaron una acción significativa en células NK (217), pero mediaron una notoria promoción de la apoptosis en neutrófilos. Por último, el anticuerpo monoclonal anti-CD16, promovió la apoptosis en células NK mientras que no ejerció efecto alguno en los neutrófilos (217).

Estudios desarrollados en 1997 por Belen de Andrés y colaboradores (219) mostraron en cultivos de médula ósea murinos, que el añadido de anticuerpos monoclonales anti-RFcγ, promovía la apoptosis de los precursores de eosinófilos a través de un mecanismo que involucraba la microagregación del RFcγII y se asociaba a un incremento en la expresión del fas. No sólo los precursores inmaduros, sino también eosinófilos murinos maduros, aislados a partir de un granuloma hepático en ratones infectados por *Schistosoma mansoni,* mostraron un incremento sustancial en los porcentuales de células apoptóticas, a consecuencia de la activación del RFcγII (219).

Experiencias realizadas en los últimos meses en nuestro laboratorio indican, además, que otros tipos celulares mieloides serían también capaces de sufrir apoptosis a consecuencia del tratamiento con CI. Observamos que el cultivo de la línea celular mieloide U937 en presencia de CIp durante 48 hs conduce a la muerte por apoptosis de un alto número de células. En contraste, una

segunda línea celular mieloide, la línea HL-60, no muestra inducción alguna de apoptosis al ser cultivada en idénticas condiciones (resultados no publicados).

Numerosos trabajos realizados en diferentes tipos celulares han sugerido que el estrés oxidativo constituye un mediador relevante de la apoptosis (revisión en cita 198). Muchos de los agentes físicos y químicos inductores de apoptosis estimulan, además, la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO). La radiación ionizante y ultravioleta, de reconocida actividad pro-apoptótica, genera IRO tales como H_2O_2 y $OH^{\cdot}$ (radical hidroxilo). El estrés oxidativo puede inducirse también, por depleción de los agentes *secuestradores* de IRO intracelulares. Así, el tratamiento con butionina sulfoxamina, que depleta el contenido intracelular de glutatión, incrementa la susceptibilidad celular a la apoptosis. Por último, la exposición a bajas concentraciones de H_2O_2, es capaz de inducir el proceso apoptótico en diversas poblaciones celulares, planteando un vínculo directo entre estrés oxidativo y promoción de la apoptosis (198,220,221).

Los mecanismos a través de los cuales los IRO median la inducción de apoptosis no han sido aún definidos con claridad. La mayoría de los estudios dirigidos a analizar este aspecto se han desarrollados en células linfoides y diversas células tumorales. Es conocida la capacidad de los IRO de inducir efectos lesivos en el DNA. Se ha demostrado que el daño del DNA mediado por IRO se asocia a la activación de la enzima *poly-ADP-ribosa transferasa,* proceso que conduce a una rápida depleción de las reservas de NAD/NADH y a un colapso de las reservas de ATP. Este conjunto de fenómenos conduce a la muerte celular. El estrés oxidativo, por otra parte, media la oxidación de moléculas lipídicas presentes en la membrana celular, entre ellas, ácidos grasos poliinsaturados y colesterol. La adición de estos lípidos oxidados a cultivos celulares es capaz de promover la apoptosis celular. Se ha propuesto, también, que los IRO tendrían capacidad de activar genes responsables de la promoción de la apoptosis. Esta acción involucraría factores transcripcionales nucleares sensibles al estrés oxidativo, tales como el NF-kB (198,220,221).

La participación de los IRO en la activación del programa apoptótico fue también analizada en neutrófilos humanos. Kasahara y colaboradores (199) sugirieron que los IRO constituyen mediadores relevantes tanto de la apoptosis espontánea como también de aquella inducida por anticuerpos con especificidad hacia la molécula fas. Esta presunción es sostenida básicamente por dos grupos de observaciones: a) la existencia de un marcado retraso en la apoptosis espontánea de

neutrófilos provenientes de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica y b) la acción inhibitoria ejercida por la catalasa sobre la progresión del fenómeno apoptótico. Experiencias desarrolladas por Oishi y Machida (202), por otra parte, han demostrado que el agregado de antioxidantes al medio de cultivo previene parcialmente la apoptosis. Watson y colaboradores (201), por último, encontraron que la depleción de las reservas de glutatión intracelular se asocia a la estimulación de la apoptosis en el neutrófilo.

En experiencias realizadas en los últimos meses nosotros hemos reexaminado las conclusiones de Kasahara y colaboradores (199). Estudiando un único paciente con enfermedad granulomatosa crónica severa, en discordancia con sus observaciones, no hemos encontrado diferencias en la velocidad con la cual los neutrófilos desarrollan apoptosis espontánea. Por otra parte, coincidiendo con sus resultados, hemos observado que la adición de catalasa al medio extracelular previene la apoptosis de los neutrófilos normales, tanto espontánea como inducida por anticuerpos anti-fas. No obstante, esta acción preventiva solo se manifiesta en cultivos de corta duración (18-24 hs). Al examinar los índices porcentuales de apoptosis luego de 36 hs de cultivo, en neutrófilos incubados en presencia de altas concentraciones de catalasa, observamos en todos los casos porcentuales de apoptosis cercanos al 100. Ello sugiere la existencia de vías pro-apoptóticas no oxidativas.

Considerados en conjunto, nuestros resultados sugieren que la estimulación de la apoptosis de los neutrófilos inducida por CIp y E-IgG depende de la activación del estallido respiratorio. Esta conclusión se sustenta, básicamente, en tres observaciones: a) el efecto inhibitorio de la catalasa, añadida al medio de cultivo; b) el efecto exacerbador de la azida sódica, inhibidor de hemo-enzimas, entre ellas, la catalasa y mieloperoxidasa endógenas del neutrófilo y c) la incapacidad de los CIp y E-IgG de promover la apoptosis en neutrófilos provenientes de un paciente con enfermedad granulomatosa crónica, cuyos niveles de producción de anión superóxido fueron menores al 5%, respecto de los neutrófilos controles.

Estas observaciones, si bien sostienen la necesaria participación de los IRO en la promoción de la apoptosis de los neutrófilos inducida por CIp y E-IgG, no indican que el mecanismo subyacente a la misma dependa sólo de la generación de agentes oxidantes. En este sentido, debe considerarse, en primer término, que los CIs y la IgGa, estímulos que previnieron la apoptosis de los neutrófilos, mediaron también la activación del estallido respiratorio. No obstante, teniendo en cuenta que las respuestas oxidativas generadas por ellos fueron marcadamente inferiores respecto de

las inducidas por CIp y E-IgG, podría considerarse la posibilidad que, a fin de promover la apoptosis, los niveles de IRO generados debieran superar un determinado umbral. Esta hipótesis, no obstante, encuentra en el neutrófilo un formidable obstáculo; ciertos agentes tales como el ionóforo de Ca^{2+} A23187, el cual presenta una capacidad similar a los CIp para mediar la activación del estallido respiratrio (resultados propios no publicados), no estimula la apoptosis de los neutrófilos. Por el contrario, ha demostrado mediar un notable efecto preventivo (196).

Consideradas en conjunto, estas observaciones, sugieren que los CIp y los E-IgG inducirían una segunda señal la cual, actuando junto a los IRO, promovería la apoptosis de los neutrófilos. En este sentido, teniendo en cuenta las observaciones de Belen de Andrés y colaboradores, indicando que la activación del RFcγII en eosinófilos murinos incrementa la expresión de fas, analizamos si el tratamiento de los neutrófilos con CIp o E-IgG mediaba un efecto similar. No observamos diferencias en los niveles de fas y fasL, en neutrófilos controles y en aquellos estimulados por CIp o E-IgG.

En los próximos meses intentaremos, en nuestro laboratorio, desarrollar dos líneas de trabajo. A través de la primera, buscaremos caracterizar la naturaleza de las señales transducidas a través de los RFcγ responsables tanto de la promoción, como de la prevención de la apoptosis del granulocito neutrófilo. A través de la segunda, intentaremos definir, en modelos murinos, el impacto de los CI sobre la apoptosis de los neutrófilos, durante la progresión de los fenómenos inflamatorios agudos.

6. CONCLUSIONES

1. Los complejos inmunes precipitantes (CIp) y los eritrocitos sensibilizados por anticuerpos IgG especficos (E-IgG) exacerbaron, en forma notoria, la apoptosis de los granulocitos neutrfilos humanos.

2. Los complejos inmunes solubles (CIs) y la IgG humana agregada por calor (IgGa) previnieron, significativamente, la apoptosis de los neutrfilos.

3. La acción estimulatoria inducida por los CIp y los E-IgG sobre la apoptosis de los neutrófilos fue mediada, fundamentalmente, a través del RFcγIIa.

4. La estimulación de la apoptosis por CIp y E-IgG no requirió la internalización de los CI.

5. El efecto estimulatorio mediado por CIp y E-IgG sobre la apoptosis de los neutrófilos involucra la generación de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO).

7. REFERENCIAS

1.Theofilopoulos, A.N. y Dixon, F.J.
Immune complexes in human diseases.
Am. J. of Pathol. 100: 531, 1980.

2. Muller-Erberhard, J.H.
Complement reaction pathways.
En Progress in Immunology IV, ed. Fougereau M.y Dausset, J.
Academic Press, New York, 1980, pp. 1002.

3. Kathryn Liszewsky, M. y Atkinson, P.
The complement system.
En Fundamental Immunology III, ed. Paul, W.E.
Raven Press, New York, 1993, pp.917.

4. Unkeless, J.C.
Function and heterogeneity of human Fc receptors for immunoglobulin G.
J. Clin. Invest. 83: 355, 1989.

5. Van de Winkel, J.G.J. y Anderson, C.L.
Biology of human immunoglobulin G Fc receptors.
J. Leuk. Biol. 49: 511, 1991.

6. Amigorena, S., Bonnerot, C., Drake, J.R., Choquet, D., Hunziker, W., Guillet, J. G.,Wester,P., Sautes, C., Mellamn, I. y Fridman, W.H.
Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes.
Science 256: 1808, 1992.

7. Van de Winkel, J.G.J. and Capel, P.J.A.
Human IgG Fc receptor heterogeneity. Molecular aspects and clinical implications.
Immunol. Today 14:215, 1993.

8. Deo,Y.M., Graziano, R.F., Repp, R., and van de Winkel, J.G.J.
Clinical significance of IgG Fc receptors and RFcγ-directed immunotherapies.
Immunol. Today 18: 127, 1997.

9. Daeron, M.
Fc receptor biology.
Annu. Rev. Immunol. 15:203, 1997.

10. Ravetch, J.V.
Fc receptors.
Curr. Opinion Immunol. 9:121, 1997.

11. Williams, A.F. and Neil Barclay A.
The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition.
Ann. Rev. Immunol. 6: 381, 1988.

12. Perussia, B., Dayton, E., Lazaruz, R.,Fanning, V. y Trinchieri, G.
Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells.
J. Exp. Med. 158: 1092, 1983.

13. Cohen, L., Sharp, S.,Kulczycki, A. Jr.
Human monocytes, B lymphocyteseach has structurally unique Fc receptors.
J. Immunol. 131:378, 1983.

14. Kurlander, R.J., Haney, A.F., Gartrell, J.
Human peritoneal macrophages posses two populatios of IgG Fc receptors.
Cell. Immunol. 86: 479,1984.

15. Rosenfeld, S.I., Looney, R.J., Leddy, J.P.,Phipps, D.C.,Abraham, G.N.,Anderson, C.L..
Human platelet Fc receptor for immunoglobulin G: Identification as a 40,000 molecular weight membrane protein shared by monocytes.
J. Clin. Invest.76: 2317, 1985.

16. Tax, W.J.M., Willems, H.W., Reekers, P.P.M., Capel, P.J.A., y Koene, R.A.P.
Polymorphism in mitogenic effect of IgG1 monoclonal antibodies against T3 antigen on human T cells.
Nature 304: 445,1983.

17. Warmerdan, P.A.M., Van de Winkel, J.G.J., Vlug, A., Westerdaal, N.A.C., y Capel,P.J.A.
A single aminoacid in the second Ig-like domain of the human Fc γ receptor II is critical for the human IgG2 binding.
J. Immunol. 147: 1338, 1991.

18. Warmerdan, P.A.M., Van de Winkel, J.G.J.,Gosselin, E.J., y Capel, P.J.A.
Molecular basis for the polimorphism of human Fcγ RII (CD32).
J. Exp. Med.172:109,1990.

19. Katz, H.R., Raizman, M.B., Gartner, C.S., Scott, H.C., Benson, A.C. y Frank Austen, K.
Secretory granules mediators release and generation of oxidative metabolites of arachidonic acid via Fc-IgG receptor binding in mouse mast cells.
J. Immunol. 148: 868, 1992.

20. Selvaraj, P.,Carpen, O., Hibbs, M.L. y Springer,T.A.
Natural killer and granulocyte Fcg receptor III (CD16) differ in membrane anchor and signal transduction.
J. Immunol. 143: 3283, 1989.

21. Scallon, B.J., Scigliano,E., Freedman,V.H., Miedel, M.C., Pan, I.C.E., Unkeless, J.C., y Schlondorff, D.A.
A human immunoglobulin G receptor exists in both polypeptide-anchored and phosphatidylinositolglycan-anchored forms.
Proc. Nac. Acad. Sci. USA. 86: 5079, 1989.

22. Kurosaki, T. y Ravetch, J.V.
A single aminoacid in the glycosyl phosphatidylinositol attachment domain determines the membrane topology of FcγRIII.
Nature 342: 805,1989.

23. Lanier, L., Cwirla, S.,Yu, G., Testi, R. y Philips, J.H.
Membrane anchoring of a human Fc receptor (CD16) determined by a single aminoacid.
Science 246:1611,1989.

24. Salmon, J.E., Edberg, J.C. y Kimberly, R.P.
Fcγ receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities.
J. Clin. Invest. 85: 1287, 1990.

25. Klingenstein, R.J. y Dickler, H.P.
The effect of pharmacologic agents on immune complex-induced redistribution of B-l ymphocyte Fc γ receptor.
Scand. J. Immunol. 10: 145, 1983.

26. Segal, D.M., Titus, J.A. y Dower, S.K.
The FcγR mediated endocytosis of model immune complexes by cells from the P388D1 mouse macrophage line. II. The role of ligand-induced self aggregation in promoting internalization.
J. Immunol. 130: 138, 1983.

27. Leslie, R.G.Q.
Complex aggregation: a critical event in macrophage handling of soluble immune complexes.
Immunol. Today 6: 183, 1985.

28. Dower, S.K., De Lisi, C., Titus, J.A. y Segal, D.M.
The mechanism of binding of multivalent immune complexes to Fc receptors.
Biochemistry 20: 6335, 1981.

29. Verhoef, J. y Visser, M.R.
Neutrophil phagocytosis and killing.
En The natural immune system: The neutrophil, ed. Abramson, J. y Gary Wheeler, J.
Oxford University Press Inc, Nueva York, 1993, pp.109.

30. Metzger, H.
Fc receptors and the action of antibodies, ed. Metzer, H.
ASM Publications, Washington DC, 1987.

31. Shaw, D.R. y Griffin, F.M.
Phagocytes require repeated triggering of macrophage phagocytic receptor during particle ingestion.
Nature 289: 409, 1981.

32. Babior, B.M.
The respiratory burst oxidase.
Advances in Enzymology 65: 49, 1992.

33. Rosen, G., Pou, S., Ramos, C., Cohen, M. y Britigan, B.
Free radicals and phagocytic cells.
Faseb J. 9: 200,1995.

34. Flohé, L., Beckmann, H. y Loschen, G.
Oxygen-centered free radicals as mediators of inflammation.
En: Oxidative stress, ed. Sies, H.
Academic Press Inc, Londres, 1985. pp.403.

35. Bastian, N. y Hibbs, J.
Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide syntase.
Curr. Op. Immunol. 6:131-39,1994.

36. McPhail, L.
SH3-dependent assembly of the phagocytes NADPH oxidase.
J. Exp. Med. 180: 2011,1994.

37. Mills, E.L. y Noya, F.J.D.
Congenital neutrophils deficiencies.
En The natural immune system: The neutrophil. ed. Abramson, J. y Gary Wheeler, J.
Oxford University Press Inc, Nueva York,1993. pp.194.

38. McPhail, L.C. y Harvath, L.
Signal transduction in neutrophil oxidative metabolism and chemotaxis.
En The natural immune system: The neutrophil, ed. Abramson, J. y Gary Wheeler, J.
Oxford University Press Inc, Nueva York, 1993. pp. 63.

39. Ganz, T., Selsted, M., Babior, B. y Curnutte, J.
Neutrophils and host defense.
Ann. Intern. Med. 109: 127,1988.

40. Weiss, S.
Tissue destruction by neutrophils
New Engl. J. Med. 320: 365,1989

41. Klebanoff, S.J.
Myeloperoxidase-mediated cytotoxic system.
En: The reticuloendothelial system. Vol. 2: Biochemistry and metabolism, ed. Sbarra, A.J. y Strauss, R.R.
Plenum Press, New York, 1980, pp.279.

42. Bielsky, B.H. y Allen, A.O.
Mechanism of disprotionation of superoxide radicals.
J. Phys. Chem. 81: 1048, 1977.

43. Jensen, M.S. y Bainton, D.F.
Temporal changes in pH within the phagocytic vacuole of the polymorphonuclear neutrophilic leukocytes.
Cell. Biol. 56: 379,1973.

44. Chance, B., Sies, H. y Boveris, A.
Hidroperoxide metabolism in mammalian organs.
Physiol. Rev. 59: 527, 1979.

45. Hyslop, P.A., Hinshaw, D.B. y Halsey W.A.
Mechanisms of oxidant mediated-cell injury: the glycolytic and mitocondrial pathways of ADP phosphorilation are major intracelular targets inactivated by hydrogen peroxide.
J. Biol. Chem. 263: 1665,1988.

46.Thomas, L.T. y Lehrer, R.I.
Human neutrophil antimicrobial activity.
Rev. Infect. Dis. 10, suppl. 2: S450, 1988.

47. Rosen, G., Pou, S., Ramos, C., Cohen, M. y Britigan, B.
Free radicals and phagocytic cells.
Faseb J. 9: 200, 1995.

48. Test, S.T. y Weiss, S.J.
The generation of utilization of chlorinated oxidants by human neutrophils.
Adv. Free Radical Biol. Med. 2: 91, 1986.

49. Albrich, R.J., Gilbaugh, J.H.,Callahan, K.B. y Hurst, J.K.
Effect of the putative neutrophil-generated toxin, hypochlorous acid on membrane permeability and transport systems of *Escherichia coli*.
J. Clin. Invest. 78: 177, 1986.

50. Rakita, R.M., Michel, B.R. y Rosen, H.
Mieloperoxidase mediated inhibition of microbial respiration: damage to *Escherichia coli* ubiquinol oxidase.
Biochemistry 28: 3031, 1989.

51. Winterbourn, C.C., van der Berg, J.J. Roltman, E.y Kuipers, F.A.
Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with hypochlorous acid.
Arch. Biochem. Biophys. 296: 547, 1992.

52. Henson, P.M., Henson, J.E., Fitlschen, C., Kimani, G., Bratton, D.L. y Riches, D.W.H.
Phagocytic cells: degranulation and secretion.
En Inflammation: basic principles and clinical correlates. ed. Gallin, J.I., Goldstein, I.M. y Snyderman, R.,
Raven Press, Nueva york, pp.363, 1988.

53. Janoff, A.
Elastase in tissue injury.
Annu. Rev. Med. 36: 207, 1985.

54. Weiss, S.J. y Peppin, G.J.
Collagenolytic metalloenzymes of the human neutrophil: characteristics, regulation and potential function in vivo.
Biochem. Pharmacol. 35: 3189,1986.

55. Peppin, G.J. y Weiss, S.J.
Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils.
Proc. Nac. Acad. Sci. USA 83:4322-6,1986.

56. Odeberg, H. y Olsson, I.
Mechanisms for the microbicidal activity of cationic proteins of human granulocites.
Infect. Immunun. 14: 1269,1976.
57. Ganz, T., Selsted, M., Babior, B. y Curnutte, J.
Neutrophils and host defense.
Ann. Intern. Med. 109: 127,1988.

58. Sturm, R.J. y Chang, J.Y.
Neutrophil-derived lipid mediators of inflammation
En: Immunopharmacology, ed. Gilman, S.C. y Rogers, T.J.
The Telford Press, Caldwell, New Jersey, 1989, pp.89-104.

59. Sato, M., Nakamura, T. y Koyama, J.
Different abilities of two distinct Fcg receptors on guinea pig polymorphonuclear leukocytes to trigger the arachidonic acid metabolic cascade.
FEBS letters 224: 29, 1987.

60. Smith, R.J., Yein, F.S., Speciale, S.C. y Bowman, B.J.
A possible requirement for arachidonic acid lipoxygenation in the mechanism of phagocytic degranulation by human neutrophils stimulated with aggregated immunoglobulin G.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 136: 310, 1986.

61. Irvine, R.F.
How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells?
Biochem. J. 204: 3, 1982.

62. Parker, C.W.
Lipid mediators produced through the lipoxygenase pathway.
Ann. Rev. Immunol. 5: 65, 1987.

63. Larsen, G.L. y Henson, P.M.
Mediators of inflammation.
Ann. Rev. Immunol. 1: 335, 1983.

64. O'Flaherty, J.T., Wykle, R.L., Thomas, M.J. y McCall, G.E.
Neutrophil degranulation responses to combinations of arachidonate metabolites and platelet-activating factor.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 43: 3, 1984.

65. Goetzel, E.J. y Pickett, W.G.
The human polimorphonuclear leukocyte chemotactic activity of complex hydroxy -eicosatetraenoic acid.
J. Immunol. 125: 1789, 1980.

66. Palmer, R.M.J., Stepney, R.J. y Eakins, K.E.
Chemokinetic activity of arachidonic acid lipoxygenase products of leukocytes of different species.
Prostaglandins 20: 411, 1980.

67. Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M.U., Shipley, M.E. y Smith, M.J.H.
Leukotriene B_4, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polimorphonuclear leukocytes.
Nature 286: 264, 1980.

68. Bokoch, G.M. y Reed, P.W.
Effect of various lipoxygenase metabolites of arachidonic acid on degranulation of polimorphonuclear leukocytes.
J. Biol. Chem. 256: 5317, 1981.

69. O'Flaherty, J.T., Thomas, M.J., Lees, C.J. y McCall, G.E.
Neutrophil aggregating activity of monohydroxyeicosatetraenoic acids.
Am. J. Pathol. 104: 55, 1981.

70. O'Flaherty, J.T.
Neutrophil degranulation: evidence pertaining to its mediation by the combined effects of leukotriene B_4, platelet-activating factor, and 5-HETE.
J. Cell. Physiol. 122: 229, 1985.

71. O'Flaherty, J.T., Thomas, M.J., McCall, G.E. y Wykle, R.L.
Potentiating actions of hydroxyeicosatetraenoates on human neutrophil degranulation responses to leukotriene B_4 and phorbol myristate acetate.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 40: 475, 1983.

72. Serhan, G.N. Hamberg, M. y Samuelson, B.
Lipoxins: a novel series of biological active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5335, 1984.

73. Ramstedt, U., Ng, J., Wigzell, H., Seaham, C.N. y Samuelson, B.
Actions of a novel eicosanoids lipoxin A & B on human natural Killer cell cytotoxicity: effects on intracellular cAMP an target cell binding.
J. Immunol. 135: 3434, 1985.

74. Vanderhoek, J.Y., Karim, M.T. y Ekboug, S.L.
Endogenous hydroxyeicosatetraenoic acids stimulate the human polymorphonuclear leukocyte 15-lipoxygenase pathway.
J. Biol. Chem. 260: 15483, 1985.

75. Pinkard, R.N., Ludwig, J.C. y McManus, L.M.
Platelet-activating factors.
En: Inflammation: Basic principles and clinical correlates, ed. Gallin, J.I., Goldstein, I.M. y Snyderman, R.
Raven Press, New York, 1988, pp. 139.

76. Geffner, J.R., Schattner, M.A., Lazzari, M.A. y Isturiz, M.A.
Gamma interferon enhances PAF-acether production by stimulated human polymorphonuclear leukocytes.
Scand. J. Immunol. 33: 575, 1991.

77. Berton, G., Zeni, L., Cassatella, M.A. y Rossi, F.
Gamma interferon is able to enhance the oxidative metabolism of human neutrophils.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 138: 1276, 1986.

78. McManus, L.M., Hanahan, D.J. y Pinckard, R.N.
Human platelet stimulation by acetyl glyceryl ethyl-phosphoryl-choline (AGEPC).
J. Clin. Invest. 67: 903, 1981.

79. Lad, P.M., Olson, C.V. y Grewall, I.S.
Platelet-activating factor mediated effects on human neutrophil function are inhibited by pertussis toxin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 129: 632, 1985.

80. Shaw, J.O., Pinckard, R.N., Ferrigni, K.S., McManus, L.M. y Hanahan, D.J.
Activation of human neutrophils with 1-O-hexadecyl-octadecyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphoryl-choline (PAF).
J. Immunol. 127: 1250, 1981.

81. Ingraham, L.M., Coates, T.D., Allen, J.N., Hoggins, C.P., Bachner, R.I. y Boxer, L.A.
Metabolic, membrane and functional responses of human polymorphonuclear leukocyte to platelet-activating factor.
Blood 59: 1259, 1982.

82. Findley, S.R., Lichtenstein, L.M., Hanahan, D.J. y Pinckard, R.N.
The contraction of guinea pig ileal smooth muscle by acetyl glyceryl ether phosphoryl-choline.
Am. J. Physiol. 241: C130, 1981.

83. Geffner, J.R.
Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity.
En: Encyclopedia of Immunology, ed. Roitt, I.M. y Delves, P.J.
Academic Press, Londres, 1993, pp. 100.

84. Key, M.E. y Haskill, S.
The role of macrophage-mediated ADCC in defense against disease. A potential antitumor defense mechanism.
En: Macrophage mediated ADCC, ed. Koren, H.S.
Marcel Dekker, Inc., 1983, pp. 237.

85. Mannik, M.
Pathophysiology of circulating immune complexes.
Arthr.Rheumat. 25:783, 1982.

86. Nydegger, V.E., Kazatchkine, M.D. y Lambert, P.H.
Involvement of immune complexes in Diseases.
En: Progress in Immunology IV, ed. Fougereau, M. y Dausset, J.
Academic Press, New York, 1980, pp: 1025.

87. Haynes, B.F. y Katz, P.
The spectrum of vasculitis.
Ann. Intern. Med. 89: 660, 1978.

88. Henson, P., Fantone, J.C. Ward, P. y Dreisin, R.B.
Immune complex injury of the lung.
Blood reviews 2: 738, 1981

89. Gallin, J.
Inflammation.
En: Fundamental Immunology III, ed. Paul, W.E.
Raven Press, New York, 1993, pp. 1015.

90. Takai, T., Li, M., Sylvestre, D., Clynes, R. y Ravetch, J.V.
FcRγ chain deletion results in pleiotropic effector cell defects.
Cell 76: 519, 1994.

91. Sylvestre, D.L. y Ravetch, J.V.
Fc receptors initiate the Arthus Reaction: Redefining the immflamatory cascade.
Science 265: 1095, 1994.

92. Kerr J.F.R., Wyllie A.H. y Currie A.R.
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.
Br. J. Cancer 26: 239, 1972.

93. Williams G.T., Smith C.A., McCarthy N.J. y Grimes E.A.
Apoptosis: final control point in cell biology.
Trends Cell Biol. 2: 263, 1992.

94. Cohen J.J.
Apoptosis.
Immunol. Today 14:126, 1993.

95. Steller H.
Mechanisms and genes of cellular suicide.
Science 267: 1445, 1995.

96. Savill J., Fadok V., Henson P. y Haslett C.
Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis.
Immunol. Today 14: 131, 1993.

97. Ellis R.E., Yuan J. y Horvity H.R.
Mechanisms and functions of cell death.
Annu. Rev. Cell. Biol. 7: 663, 1991.

98. Thompson, C.B.
Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.
Science 267: 1456, 1995.

99. Kroemer,G.
The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis
Nature Medicine 3: 614, 1997.

100. Savill, J.
The innate immune system: recognition of apoptotic cells.
En: Apoptosis and the immune response, ed. Gregory C.D.
Wiley-Liss,New York, pp 341, 1995.

101. Savill, J., Fadok, V., Henson, P. y Haslett, C.
Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis.
Immunol. Today 14: 131, 1993.

102. Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R. y Currie, A.R.
Cell death: The significance of apoptosis.
Int. Rev. Cytol. 68: 251, 1980.

103. Duvall, E. y Wyllie, A.H.
Death and the cell.
Immunol. Today 7: 115, 1986.

104. Cagan, R.L. y Ready, D.F.
The emergence of order in the Drosophila pupal retina.
Devel. Biol. 136: 346, 1989.

105. Oberhammer, F., Wilson, P.R. y Sikorska, M.
Apoptotic death in epithelial cells: Cleavage of DNA to 300 and/ or 50 kb fragments prior or in the absence of internucleosomal fragmentation.
EMBO J. 12: 3679, 1993.

106. Filipski, J., Leblanc, J., Youdale, T., Sikorska, M. y Walker, P.R.
Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures.
EMBO J. 9: 1319, 1990.

107. Brown, D.G., Sun, X.M. y Cohen, G.M.
Dexamethasone- induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation.
J.Biol. Chem. 268: 3037, 1993.

108. Wyllie, A.H.
Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation.
Nature 284: 555, 1980

109. Sun, X.M. y Cohen, G.M.
Mg^{2+} dependent cleavage of DNA into kilobase pair fragments is responsible for the initial degradation of DNA in apoptosis.
J.Biol. Chem. 269:14857, 1994.

110. Patel, T., Gores, G.J. y Kaufmann, S.H.
The role of proteases during apoptosis.
FASEB J. 10: 587, 1996.

111. Kaufmann, S.
Induction of endonucleolytic cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, campothecin, and other cytotoxic anticancer drugs" a cautionary note.
Cancer Res. 49: 5870, 1989.

112. Ucker, D., Obermiller, P., Eckhart, W., Apgar, J., Berger, N. y Meyers, J.
Genomic digestion is a dispensible consequence of physiological cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes.
Mol. Cell. Biol. 12: 3060, 1992.

113. Kaufmann, S., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. y Poirier, G.
Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase an early marker of chemotherapy-induced apoptosis.
Cancer Res. 53: 3976, 1996.

114. Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwieg, E. y Yuan, J.
Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1-β-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C.elegans* cell death gene ced-3.
Cell 75: 653, 1993.

115. Kuida, K., Lippke, J., Ku, G. y colab.
Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 β converting enzyme.
Science 267: 2000, 1995.

116. Ellis, H. y Horvitz, H.
Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*.
Cell 44: 817, 1986.

117. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. y Horvitz, H.
The *C. elegans* cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1β-converting enzyme.
Cell 75: 641, 1993.

118. Thornberry, N., Bull, H., Calaycay, J. y colab.
A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1β processing in monocytes.
Nature 356: 768, 1992.

119. Los, M., Van de Craen, M., Penning, L.C., Schenk, H., Westendorp, M., Baeuerle, P.A., Droge, W., Krammer, P.H., Fiers, W. y Schulze-Osthoff, K.
Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1- mediated apoptosis.
Nature 375: 81, 1995.

120. Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwieg, E. y Yuan, J.
Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1-β-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C.elegans* cell death gene ced-3.
Cell 75: 653, 1993.

121. Miura, M., Friedlander, R.M. y Yuan, J.
Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8318, 1995.

122. Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A. y colab.
Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis.
Nature 376: 37, 1995.

123. Enari, M., Hug, H. y Nagata, S.
Involvement of an ICE like protease in Fas-mediated apoptosis.
Nature 375: 78, 1995.

124. Smyth, M.J. y Trapani, J.A.
Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis.
Immunol. Today 16: 202, 1995.

125. Heusel, J., Wesselschmidt, R., Shresta, S., Russell, J. y Ley, T.
Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells.
Cell 76: 977, 1994.

126. Hayes, M.P., Berrebi, G.A. y Henkart, P.A.
Induction of target cell DNA release by the cytotoxic T lymphocyte granule protease granzyme A.
J.Exp. Med. 170: 933, 1989.

127. Shi, L., Kam, C.M., Powers, J.C., Aebersold, R. y Greenberg, A.G.
Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions.
J.Exp. Med. 176: 1521, 1992.

128. Ellis, R.E., Jacobson, D.M. y Horvitz, H.R.
Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in Caenorhabditis elegans.
Genetics 129: 79, 1991.

129. Duvall, E., Wyllie, A.H. y Morris, R.G.
Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death.
Immunology 56: 351, 1985.

130. Morris, R.G., Hargreaves, A.D., Duvall, E. y Wyllie, A.H.
Hormone induced cell death 2. Surface changes in thymocytes undergoing apoptosis.
Am. J. Path. 115: 426, 1984.

131. Dini, L., Autori, F., Lentini, A., Olivierio, S. y Piacentini, M.
The clearance of apoptotic cells in the liver is mediated by the asialoglycoprotein receptor.
FEBS Lett. 296: 174, 1992

132. Savill, J., Dransfield, I., Hogg, N. y Haslett, C.
Vitronectin receptor mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis.
Nature 343: 170, 1990.

133. Savill, J., Hogg, N., Ren, Y. y Haslett, C.
Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis.
J.Clin. Invest. 90: 1513, 1992.

134. Lawler J.
The structural and functional properties of thrombospondin.
Blood: 67: 1197, 1986.

135. Roberts, D.D., Haverstick, D.M., Dixit, D.M., Frazier, W.A., Santoro, S.A. y Ginsburg, V.
The platelet glycoprotein thrombospondin binds specifically to sulfated glycolipids.
J.Biol. Chem. 260: 9405, 1985.

136. Sun, X., Mosher, D.F. y Rapraeger, A.
Heparan sulfate-mediated binding of epithelial cell surface proteoglycan to thrombospondin.
J.Biol. Chem. 264: 2885, 1989.

137. Hall, S.E., Savill, J.S. y Haslett, C.
Fibroblast recognition of aged neutrophils is mediated by the RGD adhesion signal and is modulated by charged particles.
Clin. Sci. 78 (Suppl. 22): 17p (abstract), 1990.

138. Hughes, J y Savill, J.
The human mesangial cell vitronectin receptor mediates phagocytocis of senescent neutrophils undergoing apoptosis.
Am. Soc. Nephrol. 3: 566 (abstract), 1992.

139. Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. y Henson, P.M.
Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages.
J.Immunol. 148: 2207, 1992.

140. Cohen, J.J. y Duke, R.C.
Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death.
J.Immunol. 132: 38, 1984.

141. Martin, S.J., Lennon, S.V., Bonham, A.M., Cotter, T.G.
Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis.
J.Immunol. 145: 1859, 1990.

142. Duke, R.C., Chervenak, R. y Cohen, J.J.
Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: an early event in cell-mediated cytolysis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6361, 1983.

143. Askew, D.S., Ashman, R.A., Simmons, B.D. y Cleveland, J.L.
Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis.
Oncogene 6: 1915, 1991.

144. Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z. y Hancock, D.C.
Induction of apoptosis in fibroblasts by c-Myc protein.
Cell 69: 119, 1992.

145. Tsujimoto,Y., Finger, L.R., Yunis, J.J., Nowel, P.C. y Croce, C.M.
Cloning of the chromosoma breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosoma translocation.
Science 226: 1097, 1984.

146. Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, Y., Kuida, K., Sawa, H. y Loh, D.Y.
Targeted disruption of Bxl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3700, 1994

147. Hockenbery, D.M., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M. y Korsmeyer, S.J.
bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 6961, 1991.

148. Delia, D., Aiello, A., Soligo, D., Fontanella, E., Melani, C., Pezzella, F., Pierotti, M.A. y Della Porta, G.
bcl-2 proto-oncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cells.
Blood 79: 1291, 1992.

149. Lagasse, E. y Weissman, I.L.
bcl-2 inhibits apoptosis of neutrophils but not their engulfment by macrophages.
J.Exp. Med.179: 1047, 1994.

150. Boise, L.H., González-García, M., Postme, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nuñez, G., Thompson, C.B.
bcl-x, a *bcl*-2- related gene that functions a a dominant regulator of apoptotic cell death.
Cell 74: 595, 1993.

151. Motoyama, N., Wang, F., Roth, K.A., Sawa, H., Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, Y., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S. y colab.
Massive cell death of immature hematopoietic cells and neutrons in Bcl-x-deficient mice.
Science 267: 1506, 1995.

152. Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A. y Oren, M.
Widtype p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6.
Nature 352: 345, 1991.

153. Lotem, J. y Sachs, L.
Hematopoietic cells from mice deficient in wild-type p53 are more resistant to induction of apoptosis by some agents.
Blood 82: 1092, 1993.

154. Clarke, A.R., Purdie, D.J., Harrison, R.G., Morris, R.G., Bird, C.C., Hooper, M.L. y Wyllie, H.
Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pahways.
Nature 362: 849, 1993.

155. Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., y Nagata S.
The polypeptide encode by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis.
Cell 66: 233, 1991.

156. Nagata, S.
Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor.
Adv. Immunol. 57: 129, 1994.

157. Nagata, S. y Golstein, P.
The Fas death factor.
Science 267: 1449, 1995.

158. Cohen, P.L. y Eisenberg, R.A.
Fas/APO-1: a cell surface receptor that signal apoptosis.
In Apoptosis and the immune response. Ed.Gregory C.D.
Wiley-Liss, New York, pp 169, 1995.

159. Dhein, J., Daniel, P.T., Trauth, B.C., Oehm, A., Möller, P. y Krammer, P.H.
Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens.
J.Immunol. 149: 3166, 1992.

160. Chinnaiyan, A.S., O'Rouke, K., Tewar, M. y Dixit V.M.
FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis.
Cell 81: 505, 1995.

161. Yuan J.
Molecular control of life and death.
Curr. Opin. Cell. Biol. 7: 211, 1995.

162. Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H. y Wallach, D.
A novel protein sequence that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain.
J.Biol. Chem 270: 7795, 1995.

163. Dhein,J., Walczak, H., Baumler,C., Debatin, K-M. y Krammer, P.H.
Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/ (Fas/CD95).
Nature 373: 438, 1995.

164. Brunner,T., Mogil, R.J., LaFace, D., Yoo, N.J., Mahoubl, A., Echeverri, F., Martin, S.J., Force, W.R., Lynch D.H., Ware, C.F. y Green, D.R.
Cell autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas.
Nature 373: 441, 1995.

165. Ju, S-T., Panka, D.J., Cul, H., Ettinger, R., El-Khatib, M., Sherr, D.H., Stanger, B.Z. y Marshak-Rothstein, A.
Fas (CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation.
Nature 3737: 444, 1995.

166. Rathmell, J.C., Cooke, M.P., Ho, W.Y., Grein, J., Townsend, S.E., Davis, M.M. y Goodnow, C.C.
CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells.
Nature 376: 181, 1995.

167. Singer, G.G. y Abbas, A.K.
The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice.
Immunity 1: 365, 1994.

168. Rouvier, E., Luciani, M-F. y Golstein, P.
Fas involvement in Ca^{2+}-independent T cell-mediated cytotoxicity.
J.Exp. Med. 177: 195, 1993.

169. Haslett, C., Lee, A., Savill, J.S., Meagher, L. y Whyte, M.K.
Apoptosis (programmed cell death) and functional changes in aging neutrophils. Modulation by inflammatory mediators.
Chest 99: 6S, 1991.

170. Whyte, M.K., Meagher, L.C., MacDermot, J. y Haslett, C.
Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis.
J.Immunol. 150: 5124, 1993.

171.Squier, M.K.T., Sehnert, A.J. y Cohen, H.J.
Apoptosis in leukocytes
J.Leukoc. Biol. 57: 2, 1995.

172.Yamamoto, C., Yoshida, S., Taniguchi, H., Qin, M.H., Miyamoto, H. y Mizuguchi,Y.
Lipopolysaccharide and granulocyte colony-stimulating factor delay neutrophil apoptosis and ingestion by guinea pig macrophages.
Infect. Immun. 61: 1972, 1993.

173.Colotta, F., Polentarutti, N., Sozzani, S. y Montovani, A.
Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products.
Blood 80: 2012, 1992.

174.Gon, S., Gatanaga, T. y Sendo, F.
Involvement of two types of TNF receptor in TNF-α induced neutrophil apoptosis.
Microbiol. Immunol. 40: 463, 1996.

175.Brach, M.A., de Vos, S., Gruss, H.J. y Herrmann, F.
Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed death.
Blood 80: 2920, 1992.

176.Girard,D., Paquet, M.E., Paquin, R. y Beaulieu, A.D.
Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils.
Blood 88: 3176, 1996

177.Haslett C.
Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes.
Clin. Sci. 83: 639, 1992.

178.Liles, W.C., Kiener, P.A., Ledbetter, J.A., Aruffo, A. y Klebanoff S.J.
Differential expression of Fas (CD95) and Fas Ligand on normal human phagocytes: i mplications for the regulation of apoptosis in neutrophils.
J.Exp. Med. 184: 429, 1996.

179.-Boyum, A.
Separation of leukocytes from blood and bone marrow.
Scan. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Supl. 97): 77, 1968.

180.-Avrameas, S. y Ternynck, T.H.
The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparations of the i mmunoadsorbents.
Immunochemistry 6: 53, 1969.

181.Odell, W.D. y Heber, D.
Radioiodination of peptides and proteins for radioimmunoassays or radioreceptor assays.
En: Manual of Clinical Immunology. Eds. Rose N.R. y Fridman H.
American Society for Microbiology, Washington, pp. 329, 1980.

182.Coligan, J.E., Kruibeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. y Strober, W.
Morphological and biochemical assays of apoptosis.
En: Current protocols in Immunology.
New York: John Wiley & Sons, pp.3171, 1994.

183.Mishell, B.B., Shiigi, S.M., Henry, C., Chan, E.L., North, J., Gallily, R., Slomich, M., Miller, K., Marbrook, J., Parks, D. y Good, A.H.
Preparation of mouse cell suspensions.
En Selected methods in cellular immunology. Eds. Mishell B.B. y Shiigi S.M.
New York: WH Freeman, pp 21, 1980.

184.Nicoletti, Y., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. y Ricciardi, C.
A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry.
Immunol. Methods 139: 271, 1991.

185.Kao, J. P. Y., A. T. Harootunian, and R. Y. Tsien. 1989. Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by Fluo-3.
J. *Biol. Chem. 264 :8179.*

186.Trush, M.A., Wilson, M.E. y Van Dyke, K.
The generation of chemiluminescence by phagocytic cells.
En: Methods in Immunology, Vol. LVII, Bioluminiscence and chemiluminiscence. Ed. De Luca.
Academic Press, New York, pp. 462, 1978.

187. Geffner, J.R., M. Giordano, G. Serebrinsky, and M. A. Isturiz.
Different activation pathways involved in antibody-dependent and immune complexes triggered cytotoxicity mediated by neutrophils.
Clin. Exp. Immunol. 74:471, 1988..

188. Sulica, A., D. Metes, M. Gherman, T. L. Whiteside, and R.B. Herberman.
Divergent effects of FcγRIIIA ligands on the functional activities of human natural killer cells in vitro.
Eur. J. Immunol. 26 :1199, 1996.

189.Huizinga, T. W., F. van Kemenade, L. Koenderman, K. M. Dolman, A. E. G. von Dem Borne and P. A. Tetteroo.
The 40 kDa FcγR (FcγRII) on human neutrophils is essential for the IgG-induced respiratory burst and IgG-induced phagocytosis.
J. Immunol. 142 :2365, 1989.

190. Crockett-Torabi, E., and Fantone, J. C.
Soluble and insoluble immune complexes activate human neutrophil NADPH oxidase by distinct Fcγ receptor-specific mechanisms.
J.Immunol. 145 :3026, 1990.

191.Hundt, M., and R. E. Schmidt.
The glycosylphosphatidyl inositol-linked FcγRIII represents the dominant receptor structure for immune complex activation of neutrophils.
Eur.J. Immunol. 22 :811, 1992.

192. Haslett, C., L. A. Guthrie, M. M. Kopaniak, R. B. Johnston, and P. M. Henson.
Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide.
Am. J. Pathol. 119 :101, 1985.

193. Savill, J. S., A. H. Wyllie, J. E. Henson, M. J. Walport, P. M. Henson, and C. Haslett.
Marophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation.
J. Clin. Invest. 83 :865, 1989.

194. Watson, R. W. G., H. P. Redmond, J. H. Wang, C. Condon, and D. Bouchier-Hayes.
Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of *Escherichia coli*.
J. Immunol. 156 :3986, 1996.

195. William, R., G. Watson, Redmond, H. P., Wang, J. H., and D. Bouchier-Hayes.
Bacterial ingestion, tumor necrosis factor-alpha, and heat induce programmed cell death in activated neutrophils.
Shock 5 :47, 1996.

196. Whyte, M. K., S. J. Hardwick, L. C. Meagher, J. S. Savill and C. Haslett.
Transient elevations of cytosolic free calcium retard subsequent apoptosis in neutrophils in vitro.
J. Clin. Invest. 92 :446, 1993.

197. Trevani, A.S., Andonegui,G., Giordano, M., Nociari, M., Fontán, P., Dran, G., and Geffner, J.R.
Neutrophil apoptosis induced by proyeolytic enzymes.
Lab. Invest. 74:711, 1996.

198. Buttke, T. M., and P. A. Sandstrom.
Oxidative stress as a mediator of apoptosis.
Immunol. Today 15 :7, 1994.

199. Kasahara, Y., K. Iwai, A. Yachie, K. Ohta, A. Konno, H. Seki, T. Miyawaki, and N. Taniguchi.
Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/Apo-1)-mediated apoptosis of neutrophils.
Blood 89 :1748, 1997.

200. William, R., W.G. Watson, O. D. Rotstein, A. B. Nathens, A. P. B. Dackiw, and J. C. Marshall.
Thiol-mediated redox regulation of neutrophil apoptosis.
Surgery 120 :150, 1996.

201. Watson, R. W. G., Redmond, H. P., Wang, J. H., and D. Bouchier-Hayes.
Mechanisms involved in sodium arsenite-induced apoptosis of human neutrophils.
J. Leuk.Biol. 60 :625, 1996.

202. Oishi, K., and K. Machida.
Inhibition of neutrophil apoptosis by antioxidants in
culture medium.
Scand. J. Immunol. 45 :21, 1997.

203. Evans, W. H., and M. Rechcigl.
Factors influencing myeloperoxidase and catalase activities in polymorphonuclear leucocytes.
Biochim. Biophys. Acta 148 :243, 1967.

204. Nauseef, W. M., J. A. Metcalf, and R. K. Root.
Role of myeloperoxidase in the respiratory burst of human neutrophils.
Blood 61 :483, 1983.

205. Zhang, W., Voice, J. y Lachmann, P.J.
A systematic study of neutrophil degranulation and respiratory burst *in vitro* by defined immune complexes.
Clin. Exp. Immunol. 101: 507, 1995.

206. Crockett-Torabi E. y Fantone, J.C.
Soluble and insoluble immune complexes activate human neutrophil NADPH oxidase by distinct Fcγ receptors-specific mechanisms.
J. Immunol. 145: 3026, 1990.

207. Lund-Johansen, F., Olweus, J., Symington, F.W., Arli, A., Thomson, J.S., Vilella, R.,Skubitz, K. y Horejsi, V.
Activation of human monocytes and granulocytes by monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens.
Eur. J. Immunol. 23: 2782, 1993.

208. Fridman, W.H., Bonnerot, C., Daeron, M., Amigorena, S., Teillaud, J.L. y Sautes, C.
Structural bases of FcγReceptor functions.
Immunol. Rev. 125: 49, 1992.

209. Salmon, J.E., Edberg, J.C., Brogle, N.L. y Kimberly, R.P.
Allelic polymorphisms of human phagocyte function.
J. Clin. Invest. 89: 1274, 1992.

210. Graziano, R.F. y Fanger, M.W.
FcγRI and FcγRII on monocytes and granulocytes are cytotoxic trigger molecules for tumor cells.
J. Immunol. 139: 3536, 1987.

211. Geffner, J., Giordano, M., Serebrinsky, G. y Isturiz, M.
The role of reactive oxygen intermediates in nonspecific monocyte cytotoxicity induced by immune complexes.
Clin. Exp. Immunol. 67: 646, 1987.

212. Geffner, J. Giordano, M. Serebrinsky, G. Palermo, M. y Isturiz, M.
Neutrophil-mediated cytotoxicity triggered by immune-complexes: the role of reactive oxygen metabolites.
Clin. Exp. Immunol. 69: 668, 1987.

213. Giordano, M., Geffner, J. Serebrinsky, G. Palermo, M. y Isturiz, M.
Different requirements for the induction of antibody-dependent and immune complexes triggered cytotoxicity mediated by monocytes.
Immunol.Letters 17: 109, 1988.

214. Geffner, J., Giordano, M., Serebrinsky, G. y Isturiz, M.
Different activation pathways involved in antibody-dependent and immune complexes triggered cytotoxicity mediated by neutrophils.
Clin.Exp.Immunol. 74: 471, 1988.

215.Isturiz, M.A., Geffner, J.R., Pizzolato, M.
Two different Fc receptor dependent cytotoxic mechanism triggered by monoclonal immunoglobulins.
Immunol.Lett. (USA) 29:271, 1991.

216. M.Schattner, M.Lazzari, A.Trevani, E.Malchiodi, A.Kempfer, M.Isturiz y J.Geffner.
Activation of human platelets by immune complexes prepared with cationized human IgG.
Blood 82:3045, 1993.

217.Ortaldo, J.R., Mason, A.T. and O'Shea,J.J.
Receptor-induced death in human natural killer cells : involvement of CD16.
J. Exp. Med. 181 :339, 1995.

218.Azzoni,L., Anegon, I., Calabretta, B., and B. Perussia.
Ligand binding to FcγR induced c-myc-dependent apoptosis in IL-2-stimulated NK cells.
J. Immunol. 154 :491, 1995.

219.Andrés, B., Mueller, A.L., Blum, A., Weinstock, J., Verbeek, S., Sandor, M., and R. G. Lynch.
FcγRII (CD 32) is linked to apoptotic pathway in murine granulocyte precursors and mature eosinophils.
Blood 90 :1267, 1997.

220.Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin,X-M., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J.
Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis.
Cell 75:241, 1993.

221.Hirose, K., Longo, D.L., Oppenheim, J.J., Matushima, K.
Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to IL-1, TNF, selected anticancer drugs and ionizing radiation.
FASEB J. 7:361, 1993.