

Tesis de Licenciatura

Participación del sistema monoclear fagocítico en el Clearance de bacterias GRAM negativas (Escherichia coli 0111:B4) : Influencia de los anticuerpos específicos

Miliani de Marval, Paula Lucía

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:

Miliani de Marval, Paula Lucía. (). Participación del sistema monoclear fagocítico en el Clearance de bacterias GRAM negativas (Escherichia coli 0111:B4) : Influencia de los anticuerpos específicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000673_MilianideMarval

Cita tipo Chicago:

Miliani de Marval, Paula Lucía. "Participación del sistema monoclear fagocítico en el Clearance de bacterias GRAM negativas (Escherichia coli 0111:B4) : Influencia de los anticuerpos específicos". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires..

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000673_MilianideMarval

EXACTAS

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

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

**PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA MONONUCLEAR FAGOCITICO EN EL
CLEARANCE DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS (*Escherichia coli*
O111:B4). INFLUENCIA DE LOS ANTICUERPOS ESPECÍFICOS. PAPEL DE
LOS POLIMORFONUCLEARES NEUTROFILOS (PMN).**



Autor: Paula Lucía Miliani de Marval

Director: Dra. Marina Sandra Palermo.

Coordinador: Dr. Eduardo Artz

Sección Inmunología

Instituto de Investigaciones Hematológicas

Academia Nacional de Medicina

Buenos Aires

Diciembre 1998

Nº 06734

TESIS DE LICENCIATURA

I. RESUMEN:

La depuración o “*clearance*” de un antígeno, solo o formando parte de un complejo inmune (CI), es un mecanismo central de la respuesta inmune, a través del cual se eliminan partículas extrañas al organismo, sean proteínas o microorganismos. Este proceso depende de diversos factores intrínsecos del microorganismo, como así también de las características del CI formado, como por ejemplo: tamaño, carga eléctrica, relación antígeno: anticuerpo, clase de inmunoglobulina, entre otros. Estas variables regulan la velocidad del *clearance* así como el órgano y tipo celular que participan en el mismo. Del tipo celular involucrado dependen a su vez las consecuencias de tal captación. En este sentido es sabido que el sistema mononuclear fagocítico (SMF) distribuido fundamentalmente en el bazo y el hígado tiene un rol central en la eliminación de CI particulados. Sin embargo, el rol de los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) que infiltran los órganos de depuración durante una infección no ha sido exhaustivamente analizado.

A lo largo del presente trabajo se analizó en un modelo murino la participación del sistema mononuclear fagocítico, en el *clearance* de *Escherichia coli* O111:B4, sola o formando parte de complejos inmunes (CI) y la influencia de los anticuerpos específicos de tipo IgG inoculada directamente a la vía sistémica. La combinación de técnicas de marcación con radioactivos y fluorescencia nos permitió analizar cuantitativamente el órgano de captación y la población involucrada respectivamente.

Los estudios cinéticos en sangre periférica demostraron que los anticuerpos inducen un marcado aumento en la velocidad de *clearance* de la bacteria. Esta afirmación es válida no solo cuando la bacteria es sensibilizada *in vitro* previo a su inoculación, sino también cuando el complejo bacteria-anticuerpo se formó *in vivo*, por inoculación de la bacteria en animales previamente inmunizados.

El *clearance* rápido de la bacteria-anticuerpo de la sangre periférica se correlaciona a su vez con distintos fenómenos:

- 1)- Aumento de la captación de bacteria en pulmón
- 2)- Mayor afluencia de neutrófilos a dicho órgano, expresando una alta capacidad fagocítica.

3)- A concentraciones bajas de bacterias, el anticuerpo indujo una mayor sobrevida y una rápida recuperación de los animales.

Nuestro resultados también destacaron la alta capacidad bactericida que poseen los PMN respecto a los macrófagos residentes en hígado y bazo. Dado que en estos órganos se observó una alta persistencia de las bacterias a lo largo del tiempo (por lo menos 48 hs.); mientras que en pulmón la desaparición es tan rápida que ya a las 24 hs. prácticamente se ha eliminado el 100% de lo captado (Figuras 3, 4 y 5 respectivamente). Nuestros resultados sugieren que el *clearance* en pulmón de bacterias sensibilizadas con anticuerpos, depende del reclutamiento de un alto número de PMN al sitio de infección y del proceso de activación de las células fagocíticas inflamatorias. La observación simultánea de que el proceso de eliminación de la bacteria, y la aparición de PMN a los sitios de captación de la misma sugieren fuertemente que los PMN poseen un papel fundamental en la resolución de la infección. En el modelo utilizado, observamos que los PMN que migran a los tejidos provienen del pool de neutrófilos circulantes. La profunda neutropenia observada a los pocos minutos de inoculada la bacteria, se asoció a un aumento en el porcentaje de los PMN en los órganos involucrados en el *clearance* (Figura 13, 14, 15, 16).

Considerando que la activación de complemento conduce a la generación de poderosos estímulos quimiotácticos para el reclutamiento de neutrófilos, evaluamos la participación de este sistema en los fenómenos de *clearance*. Para ello realizamos inyecciones seriadas de factor anti complementario de veneno de cobra (FVC) (87). A través de este esquema experimental se eliminan los productos generados por la activación del complemento. Los resultados demostraron que el tratamiento con FVC, no modificó sustancialmente el *clearance* de EA, aunque si bloqueó significativamente el atrapamiento en pulmón. Podemos concluir que en la migración de neutrófilos al pulmón al inocular el complejo bacteria-anticuerpo, los factores de complemento juegan un papel destacado. El hígado y el bazo compensaron la disminución de la captación por los pulmones, no afectando la velocidad de *clearance* de circulación.

Contrariamente el tratamiento con FVC disminuyó significativamente la velocidad de *clearance* de la bacteria sin sensibilizar, sugiriendo que en este caso, el complemento tendría un papel importante como opsonina de la bacteria, facilitando la

adherencia a células macrofágicas y/o neutrófilos. A su vez, ambos resultados vistos en conjunto dan sustento a la hipótesis que los complejos bacteria-anticuerpo son fagocitados por interacción de las IgG con sus RFcγ sobre las células del SMF y/o PMN.

Para evaluar la participación de las moléculas de adhesión en la migración de neutrófilos en respuesta a la inoculación de bacteria o bacteria-anticuerpo, tratamos a los ratones con anticuerpo monoclonal anti CD11b/CD18 antes de los estudios de *clearance*. Los resultados obtenidos muestran que la captación de bacteria-anticuerpo por el pulmón está disminuida, aunque sin observarse diferencias significativas en la cinética de depuración de sangre periférica. Estos datos sugieren que en la migración de los neutrófilos al pulmón luego de la inoculación de EA, participan activamente los mecanismos dependientes de las adhesinas.

Los resultados obtenidos por tratamiento con FVC y anti Mac-1, sugieren que al impedirse a los PMN circulantes migrar al pulmón, los complejos EA se distribuyen en los otros órganos del SMF, hígado y bazo. Debido a que el bloqueo de la migración de neutrófilos al pulmón inhibe la captación de los complejos EA, deducimos que al menos parte de dichos complejos son llevados a dicho órgano post fagocitosis en sangre periférica y que tal vez el mismo proceso de fagocitosis induce cambios en los PMN que afectan su migración dirigiéndolos principalmente a los pulmones.

Por último analizamos los efectos biológicos producidos por el complejo bacteria-anticuerpo utilizando diferentes cantidades de bacteria. A bajas dosis de bacteria, el anticuerpo induce un efecto protector en la sobrevida de los animales al compararse con los aquellos inoculados con bacteria sola. En cambio, al aumentar el número de bacterias se observó un efecto tóxico ante la presencia de anticuerpos, dado que la mortalidad fue superior al 50% durante las tres primeras horas, mientras que por inoculación única de bacterias, la mortalidad de los animales se produjo después de las 24 hs. y probablemente sea como consecuencia de un shock séptico. A través de estudios de histopatología pudo determinarse que la presencia de anticuerpos induce una clara afluencia e infiltración de PMN al pulmón induciendo el colapso y pérdida de la citoarquitectura del mismo, con manifestación de fenómenos edematosos, que en conjunto indicarían que la muerte observada pudo deberse a una bronconeumonía o a un shock anafiláctico. Por inoculación de bacterias sola, y en todo el

rango de dosis estudiadas para EA, no se observaron ninguno de estos fenómenos descriptos anteriormente.

Al tratar previamente a los ratones con diclorometilendifosfonato encapsulado en liposomas (Lip-clod), que a las dosis inoculadas solo elimina a los macrófagos hepáticos y esplénicos, encontramos que la velocidad de *clearance* solo se modificó en el grupo inoculado con bacterias sin que sea afectada por la presencia de anticuerpos comparados con el control. En ambos grupos la captación en los órganos fue dirigida por los pulmones. Si bien los efectos inducidos por esta droga no modificaron la mortalidad de los animales inoculados con bacteria, fue en cambio, determinante en la sobrevida de aquellos inoculados con EA. Observamos que por eliminación de los macrófagos hepáticos y esplénicos, la sobrevida del grupo EA es del 100 % aún superadas las 72 hs. p.i. Al realizar los estudios de histopatología, se demostró que por tratamiento con Lip-clod, si bien el número de neutrófilos en pulmón, fue prácticamente el mismo que en los controles (sin Lip-clod y con EA) los fenómenos de infiltración se vieron marcadamente retardados observándose un número importante de PMN marginales, no vistos en los controles. Esto indicaría que la mortalidad estaría asociada a la infiltración de los PMN al pulmón, los que posiblemente induzcan el daño tisular encontrado en el mismo. En conjunto estos resultados sugieren que los macrófagos alveolares, serían capaces de reclutar el mismo número de PMN que cuando todas las poblaciones macrofágicas se encontraban intactas, aunque sería necesario algún tipo de señal proporcionada por la vía sistémica, para determinar la infiltración de los PMN, ya que estos se encontraron mayoritariamente marginales. Nosotros proponemos que en los ratones inoculados con Lip-clod, los macrófagos alveolares, probablemente no producen el nivel de citoquinas específicas necesarias para la inducción de una expresión aumentada de moléculas de adhesión las cuales podrían luego permitir la posterior extravasación de los PMN a los espacios aéreos. En este contexto, el tratamiento es altamente efectivo en reducir la intensidad de la respuesta inflamatoria y el daño pulmonar asociada con una disminución del influjo de neutrófilos (87). Proponemos que la alta tasa de mortalidad inducida por inoculación de EA podría estar asociada a una anafilaxis debido a la interacción entre IgG I y el receptor para la porción Fc de las IgG de RFcγ.

A.- INTRODUCCION GENERAL y OBJETIVOS:

La depuración o “*clearance*” de un antígeno, solo o formando parte de un complejo inmune (CI), es un mecanismo central de la respuesta inmune, a través del cual se eliminan partículas extrañas al organismo, sean proteínas o microorganismos. Este proceso depende de diversos factores intrínsecos del microorganismo y características del CI formado como por ejemplo: tamaño, carga eléctrica, relación antígeno: anticuerpo, clase de inmunoglobulina, entre otros. Estas variables regulan la velocidad del *clearance* así como el órgano y tipo celular que participan en el mismo. Del tipo celular involucrado dependen a su vez las consecuencias de tal captación.

En este sentido es sabido que el sistema mononuclear fagocítico (SMF) distribuido fundamentalmente en el bazo y el hígado tiene un rol central en la eliminación de CI particulados. Sin embargo, el rol de los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) que infiltran los órganos de depuración durante una infección no ha sido exhaustivamente analizado. Si bien diversos autores han asociado dicha infiltración con un mayor daño tisular, el bloqueo de los PMN ha mostrado efectos adversos en la erradicación de una infección. Paralelamente, la eliminación *in vivo* de macrófagos no reduce significativamente los mecanismos de *clearance* de diversos microorganismos, tales como: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Trypanosoma musculi*, entre otros.

El objetivo central del presente seminario de licenciatura consiste en estudiar el papel del SMF en el *clearance* de bacterias Gram negativas, más específicamente de *Escherichia coli* O111:B4, sola o formando parte de complejos inmunes (CI) y la influencia de los anticuerpos específicos.

B.-INTRODUCCION

1.- Conceptos generales de la respuesta inmune.

El ser humano se encuentra rodeado de una variedad de agentes microbianos capaces de provocar diversas patologías y eventualmente su muerte. La razón de que nuestro organismo sobreviva a dichas infecciones se debe a que hemos desarrollado un sistema de defensa altamente eficiente. Este puede mediar dos clases de respuestas: innatas o inespecíficas y adquiridas o específicas, las que funcionando de manera coordinada, posibilitan la eliminación de los agentes patógenos.

El evento fisiológico posterior a la formación de anticuerpos es la interacción de los mismos con sus antígenos específicos, conduciendo a la formación de los complejos inmunes (CI). La formación de dichos complejos es seguida por una serie de reacciones secundarias que permiten al cuerpo neutralizar y eliminar microorganismos y moléculas extrañas que pasaron la primer barrera de defensa (1). Dichas respuestas secundarias son independientes del antígeno pero dependientes de la clase y subclase de anticuerpo involucrado y del tipo de CI formado. Estos mecanismos efectores son altamente versátiles y pueden dividirse en mecanismos efectores humorales y celulares.

Los mecanismos efectores humorales involucran la activación del sistema de 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, no sólo a la lisis de microorganismos y células tumorales sino también al reclutamiento local de células del sistema inmune, debido a la generación *in situ* de potentes factores quimiotácticos y anafilácticos como C3a y C5a (3,4).

Los mecanismos efectores celulares son activados a través del fragmento Fc de los anticuerpos con sus receptores específicos (RFc) expresados en la superficie de diversas poblaciones leucocitarias. Dichos mecanismos comprenden la fagocitosis, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), la citotoxicidad por productos derivados del O₂ inducida por CI (Ctx-CI), entre otros. Los RFc cumplen así un papel de suma importancia en la respuesta inmunológica mediando la activación de numerosas funciones.

El fin último de esta respuesta inmune es la eliminación del agente infeccioso.

La inactivación y eliminación de estos "invasores" previene su deposición impidiendo la multiplicación (en el caso de los microorganismos) o la inducción de daño tisular (en el caso de toxinas y enzimas). El proceso dinámico de eliminación de microorganismos o *clearance* por el sistema mononuclear fagocítico (SMF), debe ser muy eficiente en condiciones normales ya que, a pesar de estar expuestos a patógenos extraños constantemente, los CI no se acumulan normalmente ni en la sangre ni en los órganos (1). En situaciones patológicas donde los CI no son eficientemente eliminados los mismos activan poderosos mecanismos efectores humorales y celulares, que pueden ser desfavorables para el huésped, como la generación de procesos inflamatorios crónicos (lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoidea, vasculitis) (5).

2.- Sistema Complemento:

El sistema complemento constituye un complejo de por lo menos 20 proteínas y glicoproteínas plasmáticas, química e inmunológicamente diferentes, capaces de actuar en forma consecutiva una con otra, con el anticuerpo y con las membranas celulares. Estas proteínas tienen como función primaria la mediación directa de los procesos inflamatorios, la opsonización de los antígenos extraños para la fagocitosis y la lisis de una amplia variedad de células, bacterias y virus (6). Además el complemento es capaz de reclutar otros sistemas efectores humorales y celulares, por ejemplo induciendo la liberación de histamina de los mastocitos (7), la migración (quimiotaxis) y agregación de neutrófilos y monocitos (8, 9), y la liberación de los constituyentes lisosomales de los fagocitos. Otro efecto del complemento de importancia biológica es favorecer la solubilización de los complejos inmunes, a través de modificaciones en el tamaño y composición de los mismos (10).

Hay dos mecanismos de activación son los denominados vía clásica y vía alterna, y son desencadenadas por estructuras diferentes. La vía clásica puede ser activada por complejos inmunes o inmunoglobulinas agregadas. Las inmunoglobulinas humanas capaces de iniciar la vía clásica son las pertenecientes a las clases IgG e IgM, siendo ésta última la más eficiente (11). La activación de la vía alterna requiere la presencia de C3b (producto derivado de la escisión del componente C3) el cual es generado en forma continua encontrándose en cantidades pequeñas en circulación. Normalmente este C3b es inactivado

con rapidez por enzimas específicas presentes en el suero. Sin embargo ante la introducción de bacterias y polisacáridos insolubles, el C3b se une a la membrana de estas células quedando protegido de los inactivadores (6).

La fase final es común en ambas vías y constituye el sistema de ataque a la membrana. Como consecuencia de las reacciones de activación sucesivas se produce la polimerización del componente C9 en un complejo cilíndrico anfifílico el cual se inserta dentro de la membrana de la “célula blanco” e induce lesiones estructurales y funciona a nivel de membrana, conduciendo a la lisis y muerte celular (12). Adicionalmente, los fragmentos moleculares generados durante la activación de cualquiera de las vías del complemento, son reconocidos por receptores específicos sobre una amplia variedad de células. La unión de estos compuestos con sus receptores celulares desencadena un número de respuestas específicas importantes en la iniciación y mantenimiento de procesos inflamatorios, algunas de las cuales se han ido mencionando anteriormente (9, 13)

Las principales anafilotoxinas del sistema complemento, C3a y C5a, son generadas como consecuencia de su activación e inducen la degranulación de los mastocitos y basófilos con la consecuente liberación de aminas vasoactivas, las cuales incrementan la permeabilidad vascular. (2,3). La actividad quimiotáctica del C5a y del C3a sería responsable, por otra parte, del influjo de neutrófilos (polimorfonucleares, PMN) al sitio de la inflamación (2,3). En particular los PMN poseen aproximadamente 50.000 sitios de binding de alta afinidad por célula, para el C5a. Una vez en el foco inflamatorio, 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 RFcy expresados por los fagocitos, y por productos bacterianos como los péptidos formilados, y los lipopolisacáridos de membrana de bacterias Gram negativas (LPS). Además el C5a induce la activación de plaquetas causando su agregación y respuesta secretoria (14). También es capaz de interactuar con las células endoteliales causando tres respuestas funcionales: expresión en superficie de P-selectinas (molécula involucrada en la adhesión de neutrófilos), secreción del factor de von Willebrand (el cual induce la coagulación intravascular), y por último, provocando la generación de O₂.

3.- Migración leucocitaria y adhesión:

Los leucocitos son los principales actores en el sistema de defensa contra los microorganismos invasores. Los primeros en llegar son los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), que lo hacen como resultado de la interacción secuencial de moléculas de adhesión. Las moléculas de adhesión presentes en los neutrófilos interactúan con sus receptores correspondientes en el endotelio de la microvasculatura induciendo la marginación y migración transendotelial. Conjuntamente con este reclutamiento de neutrófilos se produce la activación celular (15).

Los macrófagos, constituyen la segunda fase de la respuesta inflamatoria; siendo centrales en los procesos crónicos. Estos pueden ingerir y destruir microorganismos por fagocitosis. Estas células se destacan por su capacidad para secretar un gran número de citoquinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , PAF, factores del complemento, etc.). Por otro lado, los macrófagos actúan específicamente colaborando con los linfocitos polimorfonucleares (PMN) y sus productos (16).

3.1.- Moléculas de adhesión:

Las propiedades migratorias de los leucocitos juegan un papel crítico en la fisiología de la respuesta inmune. La mayor parte de los linfocitos maduros están en continua recirculación entre la sangre y los tejidos. Los monocitos y granulocitos emigran desde el lecho vascular en respuesta, en primera instancia, a modificaciones en la expresión y/o actividad de moléculas presentes en la superficie del endotelio de vénulas post-capilares, generadas en respuesta a un proceso inflamatorio vecino (17-18).

Las moléculas responsables de establecer un sistema de comunicación efectivo entre leucocitos, células endoteliales y matriz extracelular, las adhesinas, pueden ser agrupadas en 3 familias diferentes: la familia de las selectinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas y la familia de las integrinas. Las adhesinas pueden expresarse en forma constitutiva y/o ser inducidas por diversos mediadores inflamatorios (19-23).

Los leucocitos salen del torrente circulatorio atravesando las vénulas del endotelio alto y en una primera etapa se produce una adhesión primaria: los leucocitos que se encuentran circulando se unen a ligandos endoteliales o contra-receptores a través de moléculas expresadas constitutivamente en los leucocitos, denominadas selectinas. Luego la

adhesión secundaria requiere la interacción entre moléculas activadas de la familia de las β_2 integrinas y sus ligandos de la super familia de las inmunoglobulinas. La tercera etapa consiste en la extravasación de linfocitos y la cuarta en la producción de factores que regulan la retención de linfocitos en los tejidos.

Familia de las integrinas

Las integrinas son una superfamilia de glicoproteínas transmembrana que median interacciones célula-célula y célula-sustrato (24).

El CD11b/CD18 es particularmente importante en la adhesión de células mieloides a otras células y a ligandos generados por la activación de la cascada del complemento y de la coagulación (19).

El CD11b/CD18 reconoce una variedad de sustancias endógenas y exógenas incluyendo el factor de complemento C3bi, la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), el fibrinógeno, el factor X, Zymosan, β -glucanos, *Escherichia coli* y *Leishmania* (24).

La relevancia de las β_2 integrinas se manifiesta con claridad al observar el curso clínico de los pacientes que sufren LAD (*leukocyte adhesion deficiency*). En estos pacientes hay una producción o maduración deficiente de la cadena β . A consecuencia de esto, los leucocitos son defectuosos en los procesos de quimiotaxis, agregación, adherencia, fagocitosis y *binding* de C3bi, de esta manera no pueden llegar al sitio de la infección y el pus no se forma (19). Esta combinación de disfunciones lleva, en la mayoría de los casos, a un cuadro clínico severo en el cual se manifiesta una marcada susceptibilidad y predisposición a recurrentes y graves infecciones bacterianas (25, 26). Este es uno de los ejemplos más determinantes del rol de las moléculas de adhesión en la localización de los leucocitos *in vivo*.

3.2.- Polimorfonucleares neutrófilos (PMN):

La localización de los neutrófilos en respuesta a un estímulo inflamatorio agudo, es el resultado de una cascada coordinada de procesos interdependientes. La interacción secuencial entre las moléculas de adhesión expresadas por los neutrófilos y sus co-receptores en el endotelio de la microvasculatura, resulta en la marginación celular y la

migración transendotelial. En los tejidos las citoquinas sirven como atractantes de células al sitio de la injuria, aumentando las funciones de defensa del hospedador (15). Los mecanismos subyacentes a la localización de los neutrófilos, también sirven para modular la función efectora de éstas células. La interacción con la L-selectina, por ejemplo, induce la fosforilación en tirosina y la activación de la MAP kinasa y potencia la actividad del estallido respiratorio (15). El reclutamiento de neutrófilos está íntimamente unido a su actividad funcional. Las células endoteliales, por otra parte, producen las siguientes citoquinas: IL-1, IL-6, factor estimulante de colonias macrófago-granulocíticas (GM-CSF) y también el factor activador de plaquetas (PAF) que es un fosfolípido capaz de activar a los PMN (27).

La síntesis de dichos factores por las células endoteliales en respuesta a toxinas bacterianas, inducen la activación de los PMN resultando en la liberación de intermediarios reactivos del oxígeno. Además, la liberación extracelular de enzimas proteolíticas, provenientes de los gránulos de los neutrófilos, matan efectivamente a los microorganismos apresurando la resolución de la infección (15, 27). Pero, la injuria mediada por los PMN en los tejidos normales es una característica inevitable de la respuesta inflamatoria local. Más aún, los neutrófilos activados contribuirían al daño hepático y pulmonar, como así también al aumento de la permeabilidad microvascular generalizada que acompañan a los procesos de inflamación sistémica (15).

Se han documentados varios aspectos de la migración y función de los PMN luego de su movilización desde la médula ósea. Los neutrófilos migran rápidamente a los tejidos inflamados, fagocitando y matando a los microbios y a los antígenos extraños (28), muriendo luego por apoptosis. Por inyección intravascular de PMN marcados radiactivamente se ha demostrado que estos sufren un secuestro transiente en pulmón, hígado y bazo, pero no se ha visto migración de los mismos a tejidos no hematopoyéticos. También ha sido demostrado por Lovas *et al.* que el hígado es un importante sitio de marginación de PMN, pero es posible que sea además, un sitio para la remoción y la lisis de los neutrófilos (28). En el bazo, los niveles de PMN eran similares a los hallados en el hígado, sin embargo solo una pequeña porción de los PMN estaban dañados, indicando que este órgano sólo secuestra los PMN normales. Peters *et al.* (28), interpretaron estos resultados, como un importante mecanismo de captación y retención reversible de PMN, sugiriendo que el bazo sirve como reservorio de los mismos. Los neutrófilos allí secuestrados podrían ser fácilmente

movilizados, ante el estímulo adecuado (28).

La migración de los leucocitos en la circulación pulmonar difiere de la circulación sistémica porque ocurre como resultado de diferentes caminos de adhesión. Por ejemplo: el “*rolling*” de los PMN parece ser un pre requisito para un contacto más íntimo y firme con la superficie de las células endoteliales, en las vénulas poscapilares de la circulación sistémica (29). Sin embargo, en los capilares pulmonares, el secuestro de los PMN puede ocurrir como resultado del tamaño pequeño de los vasos y el prolongado contacto entre endotelio-leucocito y la activación de selectinas-integrinas de los PMN puede ser innecesario durante la cascada de migración de los neutrófilos en la circulación pulmonar. Sin embargo, el tipo de estímulo inflamatorio es un factor importante en el camino de adhesión utilizado por los PMN en la circulación pulmonar (29). Por ejemplo cuando el estímulo es inducido por la *E. coli*, IL-1 y el acetato de forbol mirístico (PMA) el mecanismo de migración de los PMN en la circulación sistémica y pulmonar, sería dependiente de CD18.

El influjo de los neutrófilos en los espacios aéreos del pulmón es necesario para el *clearance* de agentes infecciosos (30). Es importante destacar el papel de los macrófagos alveolares en el reclutamiento inicial de los PMN en pulmones infectados. Estudios recientes han demostrado que los macrófagos alveolares liberan citoquinas quimioattractantes, como el factor activador de plaquetas-4 (PF-4), que son mediadores críticos del influjo de los PMN en pulmones dañados. Los macrófagos alveolares forman la primera línea de defensa contra los microorganismos que entran por vía aérea a pulmón (30). El TNF- α , derivado de los macrófagos alveolares y de los mastocitos han sido implicados también en el reclutamiento de neutrófilos durante la respuesta inflamatoria (31).

3.3.- Macrófagos:

Los macrófagos ($M\phi$) son células multifuncionales, que pueden ser encontradas prácticamente en todos los órganos y tejidos del organismo. Su precursor directo, los monocitos, son liberados a la circulación desde la médula ósea. Por medio de la corriente sanguínea, estos monocitos migran dentro de los órganos donde se diferencian a macrófagos residentes, células de Kupffer, macrófagos esplénicos, constituyendo el sistema mononuclear fagocítico (SMF) (32).

Los macrófagos han adoptado importantes funciones en la inducción y regulación la respuesta inmune innata y adquirida (humoral y celular), y en el control de funciones celulares de muchas células no fagocíticas. Sin embargo es fundamental su función como depurador en la eliminación de material no propio, como los microorganismos, o de células propias alteradas, como los eritrocitos senescentes, complejos inmunes, productos inflamatorios, células apoptóticas y material particulado, formando parte de un importante mecanismo de homeostasis (32, 33).

Los MØ participan en muchas reacciones inflamatorias, y si bien su actividad está basada en la fagocitosis y degradación intracelular, su grado de funcionalidad depende de la producción y secreción de un panel de moléculas regulatorias tales como: citoquinas proinflamatorias, especialmente el factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interleuquina 1 (IL-1). Ambas activan a los MØ los que producen y secretan citoquinas, reclutan células inflamatorias al sitio de inflamación (32) y estimulan la producción de óxido nítrico (NO) (33).

El TNF- α es el principal mediador de los mecanismos de defensa contra infecciones bacterianas a gérmenes Gram negativos. Algunas de las actividades del TNF- α son mediar la adhesión celular de neutrófilos, monocitos y linfocitos a los endotelios, acumulando estas células en los sitios inflamatorios. A bajas concentraciones, induce en las células endoteliales la secreción de IL-8. Esta citoquina actúa sobre leucocitos neutrófilos unidos al endotelio vascular estimulando su extravasación (quimiotáxis). Además, activa la capacidad microbicida de los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos.

Si el estímulo para la producción de TNF- α fue muy intenso, puede llegar al torrente sanguíneo generando varios efectos sistémicos. Actuando sobre el hipotálamo del cerebro induce fiebre (propiedad que comparte con la IL-1). En ambos casos el efecto es mediado por la síntesis aumentada de prostaglandinas por parte de las células hipotalámicas. Actúa sobre los MØ y células endoteliales induciendo niveles de producción de IL-1 e IL-6 que alcanzan la circulación. Frente a estímulos inflamatorios actúa (junto con la IL-1 y la IL-6) sobre los hepatocitos aumentando la síntesis de proteínas de fase aguda. Activa también el sistema de coagulación, alterando el balance entre actividades pro y anticoagulantes del endotelio vascular (34).

El interferón es un agente antiviral producidas por las células de los mamíferos

en respuesta a una gran variedad de estímulos (35). Si bien la actividad originalmente descripta fue la capacidad de tornar a las células sobre las que actuaba refractarias a la infección viral, posteriormente se demostró su potente actividad inmunoreguladora. Esta modulación incluye la activación de $M\emptyset$ (33, 36), la inducción de la liberación de histamina por los basófilos (37), el aumento de la expresión de antígenos de superficie en linfocitos (122,), el aumento de la citotoxicidad T (38), el aumento de la actividad *natural killer* NK (39) y de la CCDA (31, 40).

Asimismo, la activación de los macrófagos está marcadamente inhibida por citoquinas tales como el *transforming grow factor- β* (TGF- β), IL-4, IL-10 (que inhibe la secreción de TNF- α , IL-1, IL-2 y citoquinas 41 y IL-13. Varias de estas citoquinas inhibitorias son producidas por los linfocitos T_{H2} (42).

Por último, cabe destacar el papel de los corticosteroides como reguladores de la expresión de varios genes que poseen efectos anti inflamatorios. En primer lugar, estos reducen la producción de mediadores inflamatorios, tales como las citoquinas, prostaglandinas y óxido nítrico. En segundo lugar, inhiben la migración de células inflamatorias, a los sitios de inflamación por inhibición de la expresión de las moléculas de adhesión (42).

3.3.1.- Acción del Diclorometilen Difosfonato.

La inhibición de las funciones macrofágicas, puede ser lograda *in vivo* a través de la eliminación física de los macrófagos ($M\emptyset$) en uno o más tejidos u órganos por medio de la inoculación endovenosa de liposomas conteniendo diclorometilen-difosfonato (Lip-clod). Este procedimiento se conoce con el nombre de “método del macrófago suicida” (43). Debido a la alta capacidad fagocítica de los $M\emptyset$, estos ingieren rápidamente los liposomas con la droga encapsulada vía endocitosis. Luego de la endocitosis se produce la fusión de los endosomas con los lisosomas. Estos últimos contienen enzimas lisosomales, tales como las fosfolipasas que actúan rompiendo la bicapa fosfolipídica de los liposomas provocando que la droga sea liberada en el interior de la célula (44). El lip-clod se acumula en el interior de la célula, que en altas concentraciones provoca un daño irreversible en el macrófago (30). Este proceso lleva a la muerte de éstas células por mecanismos que aún no son muy claros, pero

que podrían estar relacionados con la actividad de binding al calcio de la molécula o a la presencia de iones cloruros. El lip-clod encapsulado en liposomas, mata selectivamente a aquellos macrófagos con actividad fagocítica (45).

Esta técnica ha sido ampliamente utilizado en modelos experimentales (44) y a través de la misma se consigue inhibir la producción de citoquinas, además de bloquear la capacidad fagocítica de los MØ (46, 47) El lip-clod es inocuo para el resto de la poblaciones celulares, ya que la droga libre no puede cruzar fácilmente las membranas celulares y tiene una vida media extremadamente corta tanto en la circulación, como en los fluidos corporales (44, 48). Otra ventaja importante de este método, es que el lip-clod induce la depleción de los macrófagos, y no simplemente el bloqueo de los mismos (49, 50).

A las dosis establecidas la eliminación física de los macrófagos de hígado y bazo es máxima entre las 48-72 hs. posteriores a su inoculación, luego, los monocitos derivados de la médula ósea migran a los tejidos deplecionados de MØ y se diferencian en nuevos macrófagos. En la mayoría de los casos, todos los MØ eliminados son reemplazados en dos semanas, mientras la primer célula reaparece al final de la primera semana. Sin embargo, en el bazo, y los nódulos linfáticos, la completa repoblación de estas células con todas las sub poblaciones de MØ pueden tomar mas de un mes (32).

La eliminación de MØ específicamente en un órgano puede ser lograda variando la concentración y la vía de inoculación de los liposomas (32, 44), no afectando otros tipos celulares ni células no fagocíticas como por los linfocitos T o B (44).

4.- Complejos inmunes y receptores para el fragmento Fc de la IgG:

Es importante recordar que la interacción de anticuerpos y determinantes antigenicos es, generalmente, incapaz de neutralizar la capacidad infecciosa y/o patogénica de los microorganismos. Son entonces los complejos inmunes, 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. 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 a la atracción de células inflamatorias como los neutrófilos y macrófagos ($M\phi$), a consecuencia de la generación *in situ* de potentes agentes quimiotácticos y anafilácticos (2, 3).

Cuando las células fagocíticas (PMN y $M\phi$) arriban al sitio inflamatorio, interactúan con los productos bacterianos los componentes del complemento y/o los CI desencadenando un panel de respuestas celulares que dependen tanto del tipo de CI como del tipo celular a través de receptores específicos (RFc).

Los complejos inmunes que presentan anticuerpo IgG juegan un papel relevante en las resolución de enfermedades infecciosas. Sin embargo, como dijimos anteriormente la respuesta innata actúa coordinadamente con la respuesta específica para eficientizar los procesos. Así los tres componentes básicos en una respuesta antimicrobiana son: los CI, el sistema complemento, y las células fagocíticas.

Los receptores para el Fc (RFc) son capaces de reconocer la porción Fc de los anticuerpos, existiendo así para cada tipo de anticuerpo un RFc diferente: RFcy que une IgG, RFc α que une IgA, RFc ϵ que une IgE, RFc μ que une IgM y RFc δ que une IgD (51).

La mayoría de los RFc pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, en la cual se agrupan moléculas derivadas de un precursor génico común y, por lo tanto evolutivamente relacionadas y estructuralmente homólogas. Todos sus miembros presentan una estructura tridimensional común en la que se observa un dominio tipo-Ig, homólogo a los dominios C o V de las Igs (52).

4.1.- Receptores celulares para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas:

Existen 3 clases diferentes de RFcy descriptos tanto en humanos como en ratones (53), relacionados estructuralmente pero funcionalmente diferentes.

EL RFcyI es una glicoproteína de 70KD que une en humanos, IgG₁ e IgG₃ monomérica humana con gran afinidad y en ratón IgG_{2a} e IgG₃ de ratón. También puede unir CI debido a la presencia de tres dominios extracelulares *Ig-like*, en vez de dos como ocurre en las otras dos clases de RFcy (54). La expresión de estos receptores está restringida a fagocitos mononucleares en donde la interacción del receptor con su ligando desencadena una fuerte actividad citotóxica (55).

El Fc γ RII es una glicoproteína que une IgG monomérica con baja afinidad que se encuentra en polimorfonucleares (PMN), plaquetas, linfocitos de gránulos grandes (LGL), células *natural killer* (NK) y linfocitos B, así como también en monocitos y macrófagos. Esta clase de receptores reacciona con CI (IgG) y partículas sensibilizadas con IgG (no así con IgG monomérica) (54).

El Fc γ RIII es una glicoproteína de 50-70 KD que une IgG monomérica con baja afinidad. Está presente en macrófagos, PMN, células LGL y NK. Une también CI y partículas sensibilizadas con IgG. Existen 2 tipos de estos receptores: Fc γ RIIIA con un dominio transmembrana e intracitoplasmático convencional y el Fc γ RIIIB unido a la superficie vía un fosfatidilglicano (GPI) incapaz de generar una señal intracelular (54).

En ratones, tanto el RFc γ II como el RFc γ III unen CI formados por IgG1, IgG2a, e IgG2b pero no IgG3 (53).

4.2.- Funciones mediadas por los RFc γ

Los RFc γ están involucrados en el *clearance* de complejos inmunes (CI), fagocitosis de patógenos opsonizados con anticuerpos, refuerzo de la presentación antigenica, citotoxicidad por secreción de intermediarios reactivos del oxígeno (ROI), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) y citotoxicidad de células tumorales opsonizadas con anticuerpos (56, 57). Estos receptores son particularmente importantes en la defensa contra patógenos durante los procesos infecciosos (58, 59). La opsonización de patógenos con IgG y/o factores de complemento permite a las células reconocer una amplia variedad de organismos utilizando un número limitado de receptores (60).

4.2.1.- Clearance de CI:

Como se mencionó anteriormente la formación de CI es un proceso fisiológico que permite al SMF eliminar los microorganismos invasores y las sustancias tóxicas foráneas (1). El *clearance* de CI es un proceso dinámico, rápido y seguro y constituye una de las áreas más importantes de la patofisiología de CI. Diversos factores influencian dicho fenómeno, como ser las propiedades físico-químicas de los CI entre las que se encuentran el tamaño,

clase de anticuerpo, relación antígeno: anticuerpo, habilidad para fijar complemento, características del antígeno y las propiedades relacionadas al SMF como la expresión de receptores para componentes del complemento o para la porción Fc de las IgG (61-63). Cualquier alteración de estos factores puede afectar significativamente la velocidad de depuración o *clearance*. La persistencia de CI en circulación puede ser consecuencia de una disfunción en el SMF (61-64). En este sentido pacientes con enfermedades por CI presentan una discapacidad en el SMF para remover partículas opsonizadas con IgG (64) y como consecuencia de ello aparecen los cuadros clínicos característicos de la presencia de CI circulantes como las nefropatías y vasculitis. Asimismo, en pacientes que presentan infecciones con bacterias Gram (-) se ha encontrado una mayor capacidad depuradora (65-68).

Se ha sugerido que las células sensibilizadas con anticuerpos IgM fijadores de complemento son eliminados de la circulación en primer lugar, por el hígado, y mientras que las células recubiertas con los anticuerpos IgG a bajas concentraciones lo hacen fundamentalmente en el bazo (69). En este contexto, los anticuerpos IgG e IgM interactúan con el sistema complemento *in vivo* por mecanismos que son cualitativa y cuantitativamente diferentes, produciendo en consecuencia efectos biológicos diferentes (69). Frank *et al.* han demostrado que en los eritrocitos los sitios fijadores de complemento formados por el anticuerpo IgM se comportan diferente a los formados por IgG y que tanto el patrón de *clearance* como la localización en los órganos de las células depuradas difieren según la célula haya sido sensibilizada con alguno de las dos clases de anticuerpos (70).

Los mecanismos de *clearance* dependen de los receptores específicos que se encuentran sobre la superficie de las células fagocíticas que reconocen a los fragmentos de complemento o a la porción Fc de la molécula de anticuerpo IgG (62).

Las células de Kupffer son las principales células del SMF encargadas de la remoción desde la circulación de agregados solubles. Existen probablemente sistemas de reconocimiento de superficie que permiten a estas células adherirse a distintas sustancias e internalizarlas (71, 42). Un sistema bien descripto es aquel cuya captación está mediado por los receptores de C3b y del Fc de los complejos constituidos por IgM e IgG respectivamente. Este sistema ha sido estudiado *in vitro* para el *clearance* de complejos inmunes formados por IgG e IgM, con células de Kupffer aisladas y macrófagos peritoneales. Este sistema parece ser específico para cada tipo de complejo inmune y es saturable, al menos para los complejos

constituidos por IgG (71). El tamaño de los agregados como las cargas altamente negativas de los mismos, parece ser crítico, ya que por ejemplo, por tratamiento con tetrámeros de albúmina (que se comportan como un monómero) la captación por las células de Kupffer parece ser muy baja, sin embargo, cuando los agregados son muy grandes (mayores a 5 millones) son atrapados por los capilares del pulmón (71). A través de estos estudios se demostró que existen varios mecanismos independientes por los cuales agregados proteicos, podrían ser captados por el hígado. Algunas proteínas son reconocidas por sistemas de captación específicas, mientras otras parecen compartir mecanismos no tan comunes.

4.2.2.- Fagocitosis:

Los fagocitos, al arribar al foco inflamatorio, reconocen al microorganismo invasor, se adhieren a él y lo internalizan (72). 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 del microorganismo o se depositen en su superficie como consecuencia de la interacción del agente infeccioso con el sistema inmune del huésped. Este segundo grupo incluye a las IgG e IgM y a los factores C3b y C3bi y reciben el nombre de opsoninas (72). Ellas facilitan el reconocimiento de los microorganismos por los fagocitos, a través de su interacción con receptores. Los componentes C3b y C3bi se unen al CR1 (CD35) y CR3 (CD11b/CD18) respectivamente y la IgG a su receptor RFcy. Para la mayoría de las partículas opsonizadas, las interacciones establecidas entre C3b o C3bi y CR1 y/o CR3 promueven la adhesión del agente invasor al fagocito pero no su ingestión, mientras que la unión IgG- Fc γ R induce la adhesión e internalización (73). Dado que ambos tipos de receptores se encuentran presentes sobre los fagocitos, estas opsoninas actúan en forma cooperativa, disminuyendo la cantidad de anticuerpos necesarios para la ingestión de los microorganismos (74). 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 la partícula dando origen a una vacuola fagocítica. Es decir que la fagocitosis es dependiente del sistema de microtúbulos y/o

microfilamentos, lo que la hace sensible a la citocalasina B.

Es importante destacar que los mecanismos citotóxicos pueden clasificarse en oxígeno-dependientes y oxígeno-independientes. Los mismos pueden operar también a nivel extracelular, sobre todo cuando la partícula no puede ser fagocitada y cuando el fagocito es activado por estímulos solubles.

4.2.3.- *Mecanismos citotóxicos dependientes del oxígeno: producción de intermediarios reactivos del oxígeno.*

La activación de las células fagocíticas particularmente de los PMN, por la interacción directa de los CI con los RFcy, lleva a la liberación de potentes mediadores inflamatorios y a la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) (75) capaces de destruir la *célula blanco* en un proceso denominado citotoxicidad inducida por CI (Ctx-CI). Los IRO no sólo cumplen un papel relevante en la destrucción de microorganismos invasores, sino también en la generación de lesiones tisulares en las regiones próximas al sitio de producción (76). Los IRO incluyen radicales oxidantes, halógenos oxidados y oxígeno singulete. Son generados por reducción parcial del oxígeno molecular a través de un proceso denominado estallido respiratorio (75).

Todos los IRO producidos por los fagocitos derivan del anión superóxido (O_2^-) (75). Este último es capaz de reaccionar con una amplia variedad de sustratos biológicos originando hipohalitos (XO^-), radical hidroxilo (OH^-) y agua oxigenada (H_2O_2) (76).

El H_2O_2 es un oxidante estable capaz de ejercer efectos citotóxicos en distintos sistemas biológicos (77), no obstante, muchos tipos celulares, entre ellos los propios fagocitos y numerosos microorganismos poseen enzimas capaces de detoxificar el H_2O_2 como la catalasa y/o la glutation peroxidasa (78).

4.2.4.- *Mecanismos citotóxicos independientes del oxígeno:*

Los fagocitos contienen, además de su sistema generador de IRO, gránulos citoplasmáticos cargados de agentes anti-microbianos. Los mismos son liberados al fagolisosoma durante la fagocitosis, o al medio extracelular, en el caso de estímulos solubles

o particulados no fagocitables. Estos agentes incluyen enzimas hidrolíticas tales como fosfolipasas, glucosidasas, lisozima, mieloperoxidasa (MPO), proteasas y péptidos/proteínas capaces de alterar la fisiología de la *célula blanco* (72).

La mieloperoxidasa es una enzima presente en los gránulos azurófilos de los neutrófilos en presencia de un halógeno como por ejemplo el ion cloruro como el Cl^- , transforma el H_2O_2 en HOCl^- ; poderoso agente oxidante y antimicrobiano.

Entre las proteasas de mayor relevancia se encuentran la elastasa, la catépsina G, la colagenasa y la gelatinasa (76-78)

La elastasa es un proteasa de serina que se encuentra en altas concentraciones en los gránulos azurófilos de los neutrófilos. Es activa sobre una amplia variedad de sustratos que incluyen a casi todas las proteínas de la matriz extracelular, proteínas plasmáticas y numerosas proteínas expresadas sobre la superficie de células intactas (79, 80). Además sería importante para la locomoción de los neutrófilos para facilitar la penetración de los mismos en los tejidos.

Otras proteínas que forman parte del arsenal destructivo de los fagocitos son la lisozima y la lactoferrina. La lisozima ejerce sus funciones bacteriolíticas al hidrolizar las uniones glicosídicas de los mucopéptidos de la pared celular bacteriana. Es capaz de ejercer también efectos antimicrobianos a través de mecanismos no enzimático (81).

4.2.5.- Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

Es un mecanismo citotóxico contra *células blanco* recubiertas por anticuerpos específicos, mediado por diferentes poblaciones celulares (82). Pese a que los mecanismos 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 no sólo incluyen subpoblaciones linfocitarias sino también a los leucocitos polimorfonucleares, monocitos, macrófagos y plaquetas (82). Hasta el presente no se ha podido determinar en forma concluyente la relevancia fisiológica de la CCDA (83, 86).

Los monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares son capaces de mediar la CCDA en forma eficiente, contra diferentes tipos de *células blanco* recubiertas por

anticuerpos IgG. Su potencialidad citotóxica es regulada por la acción de diferentes citoquinas y/o productos inflamatorios. El IFN- γ , TNF- α , GM-CSF y el C5a, potencian la CCDA mediada por fagocitos; en cambio los glucocorticoides, IL-10 y ciertos agentes capaces de incrementar los niveles intracelulares de AMPc la inhiben (82).

4.2.6.- *Liberación de mediadores lipídicos de inflamación*

La estimulación de células fagocíticas por CI (86) conduce también a la liberación de mediadores lipídicos de inflamación, cuya acción autócrina o paracrína contribuye al desarrollo de la respuesta inflamatoria. Ellos ejercen efectos sobre el endotelio, el músculo liso, los leucocitos y las plaquetas. No son acumulados como mediadores preformados. Son sintetizados de novo a expensas de la activación del metabolismo fosfolipídico (86).

La interacción de los CI con los RFcy induce la liberación de ácidos grasos insaturados desde los fosfolípidos que forman parte de la membrana celular (87), entre los cuales se encuentra el ácido araquidónico, el cual al ser metabolizado genera prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX), ácidos hidroperóxidos (HPETEs), ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs) o leucotrienos (LT) (86).

5.- *Inflamación. Lipopolisacáridos bacterianos. Shock Séptico:*

La inflamación es un sistema de defensa primario rápido del organismo que se manifiesta luego de la injuria a un tejido. La inflamación se define por la presencia de calor, dolor, rubor y tumor, lo que refleja los efectos de las citoquinas liberadas por los fagocitos y la acción el sistema complemento sobre los vasos sanguíneos locales. La dilatación y el aumento de la permeabilidad de dichos vasos lleva al aumento local del flujo sanguíneo y al pasaje de fluidos, provocando calor, rubor y tumor. Los efectos de las citoquinas modifican las propiedades de adhesión al endotelio, causando la unión de leucocitos circulantes a las células endoteliales y la migración de los mismos al sitio de la infección provocando el dolor.

El objetivo de esta respuesta es el de contener o destruir el agente invasor y retirar del tejido los desechos resultantes de la respuesta inflamatoria.

Uno de los problemas más frecuentes y serios con los que se enfrentan las unidades hospitalarias de cuidado intensivo es el manejo de las infecciones con bacterias Gram negativas y de las respuestas sistémicas a dichas infecciones, síndrome que se conoce con el nombre de síndrome séptico (53-56). La fase final de este síndrome se denomina "shock séptico", el cual en términos generales presenta coagulación intravascular, disfunciones orgánicas múltiples, hipotensión y finalmente muerte (88-91).

Las manifestaciones de los cuadros sépticos incluyen aquellas relacionadas con la respuesta sistémica a la infección: taquicardia, alteraciones de la temperatura, leucocitosis; y aquellas relacionadas con las disfunciones orgánicas: anormalidades cardiovasculares, respiratorias, renales, hepáticas y hematológicas.

Actualmente se cree que la respuesta inflamatoria desmedida del huésped a la infección contribuye, sustancialmente, al desencadenamiento del shock séptico (88-91).

Las bacterias están rodeadas por una envoltura que les garantiza forma e integridad. En el caso de las bacterias Gram negativas, dicha envoltura se presenta en forma de bicapa asimétrica, en donde en la capa externa se encuentran proteínas y una clase de moléculas anfipáticas denominadas lipopolisacáridos (LPS) (88-92), mientras que en la capa interna abundan los fosfolípidos.

Actualmente, se sabe que los LPS, a través del Lípido A (componente endotóxico del LPS), interaccionan con distintos tipos celulares, entre los que se incluyen las células mononucleares (monocitos y macrófagos), células endoteliales, células musculares lisas, granulocitos polimorfonucleares y trombocitos (98). La estimulación de los leucocitos con LPS induce la liberación de citoquinas y otros mediadores inflamatorios que incrementan la respuesta de defensa del huésped contra las bacterias invasoras. Entre las citoquinas secretadas por acción del LPS, el TNF- α y la interleuquina-1 (IL-1) ejercen un rol central en la patofisiología de los fenómenos sépticos (99). Además produce el aumento de la expresión de integrinas en neutrófilos, adherencia de monocitos y macrófagos al endotelio y activación del complemento entre muchas otras funciones. También se generan intermediarios reactivos del oxígeno, mediadores lipídicos, IL-6, IL-8, IL-10 (98-101). La producción a bajos niveles de estos mediadores resulta ser benéfica y puede traducirse en la adquisición de resistencia a

infecciones o en actividad adyuvante. En cambio cuando altos niveles de mediadores alcanzan la circulación se observan efectos perjudiciales como hipotensión y shock (102).

El reconocimiento de los LPS por la superficie celular es necesario para su incorporación y para el desencadenamiento de las señales intracelulares que producen la activación celular.

Las evidencias actuales sugieren que numerosos receptores estarían involucrados en el reconocimiento y la activación celular por LPS, en la captación y detoxificación de moléculas de LPS libres (103).

El receptor mejor identificado y caracterizado, hasta la fecha, es la proteína CD14 presente en monocitos, macrófagos y en menor grado en polimorfonucleares (PMN). Dicho receptor es una glicoproteína anclada a la membrana por un enlace glicosil-fosfatidil inositol (GPI) (104). El CD14 actúa como receptor tanto para el LPS solo, como para el complejo formado por LPS-LBP (lipopolysaccharide-binding protein), la cual es una proteína sérica que une LPS (105).

A pesar de que el CD14 carece de un dominio intracelular citoplasmático, proteínas unidas a membrana por enlaces GPI, pueden asociarse con tirosinquinasas y de esta forma desencadenar señales transduccionales (106). Alternativamente, el CD14 puede actuar como un co-receptor, uniendo LPS o LPS-LBP a la superficie celular: una vez unido a la célula el LPS puede interactuar con otros receptores, amplificando la activación celular (51).

Aunque la inyección sistémica de LPS en animales ha sido un modelo experimental utilizado ampliamente para el estudio de los fenómenos inflamatorios durante las infecciones con gérmenes Gram negativos, el manejo de las bacterias por el sistema inmune tendría aspectos cualitativamente diferentes. Luego de la entrada a la circulación, el LPS experimenta una hidrólisis y metabolismo limitados y es depurado principalmente por el hígado. La forma física en la cual la endotoxina es presentada en el animal, determina como será manipulado por el hígado. Si es presentado como bacteria viva, la endotoxina es localizada en las células de Kupffer, y si el LPS está purificado de estas mismas células e injectado directamente en el animal, se localizará en los hepatocitos (107). El *clearance* del LPS purificado ocurre supuestamente a través de ciertos (scavenger) receptores sobre los hepatocitos. Estos receptores eliminan la endotoxina que ha sido químicamente modificada por el cuerpo y por lipoproteínas que la transportan (107). Estos receptores también eliminan

los peptidoglicanos que son una estructura presente en la superficies de todas las bacterias y es el principal componente de las bacterias Gram positivas. El *clearance* a través de estos receptores no inicia una respuesta a citoquinas, en contraste con la endotoxina depurada a través de las células de Kupffer. El LPS intacto se adhiere a las células de Kupffer, presumiblemente a través del CD14. Estas células son responsables principalmente de la generación e citoquinas proinflamatorias liberadas durante la endotoxemia y de la quimiotaxis de neutrófilos inmigrantes (108, 109). Las consecuencias de este proceso pueden ser importantes en cuanto a la producción de citoquinas, persistencia del antígeno en circulación y resolución final del fenómeno.

C.- MATERIALES Y MÉTODOS:

1.- Reactivos generales:

1.1.- Solución Fisiológica (SF):

La solución fisiológica (SF), fue preparada con Cloruro de Sodio, ClNa: 0,15M

1.2.- Buffer fosfato salino (PBS).

La solución fue preparada con NaCl 0,138M, KCl 0,027M, Na₂HPO₄ 0,078M y KHPO₄ 0,015M; pH: 7,4.

1.3.- Buffer carbonato:

El buffer carbonato fue preparado con NaHCO₃ 0,05M y NaCl 0,10M, (1:10, pH: 9,2).

1.4.- Buffer fosfato salino con Ca⁺⁺/Mg⁺⁺:

La solución fue preparada con 50 ml de PBS al cual se le agregaron 500 µl de CaCl₂ 100 mM y 500 µl de MgCl₂ 100 mM.

1.5.- Buffer fosfato:

La solución fue preparada con HPO₄²⁻ 0,01M, pH: 8.

1.6.- Buffer citrato-fosfato:

El buffer citrato-fosfato fue preparado con ácido cítrico 0,1M y NaHPO₄ 0,1M,

pH: 5.

1.7.- Solución reveladora para la cuantificación de MPO:

La solución reveladora se preparó con 8.5 mg de *o*-phenylendiamina por cada 25 ml de buffer citrato-fosfato adicionada con 10 μ l de H_2O_2 al 30%.

1.8.- Solución de dextrán:

Solución de Dextrán (266 Kd) al 6% en solución salina (Sigma, St., Louis, USA).

1.9.- Solución para tratamiento ácido:

La solución fue preparada con HCl/Glicina 0,1M, pH: 2.8

1.10.- Medio de cultivo utilizado para los estudios de TNF- α :

Se empleó medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO Lab., Grand Island, USA), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 1 o 3% inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 minutos (GIBCO Lab., Grand Island, USA) y gentamicina (50mg/ml).

2.- Animales.

Se utilizaron ratones machos BALB/c de 10 semanas de edad, criados en el bioterio de la División de Medicina Experimental, IIHema, Academia Nacional de Medicina.

3.- Estudios *in vivo*:

3.1.- Estudios de Clearance:

3.1.1.- Preparación de la bacteria:

Las bacterias *Escherichia. coli* O111:B4 inactivadas con formol al 5%, fueron lavadas 3 veces (8000 r.p.m. por 3 min.) con SF, eliminándose el LPS libre en solución y la azida con la que las bacterias son mantenidas hasta su uso.

3.1.2.- Marcación de bacteria con ^{51}Cr :

Las bacterias fueron marcadas con $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, New England Nuclear, Boston, MA) incubándose 500 μl de ^{51}Cr , por cada 1 ml de bacteria proveniente del stock ($1,8 \times 10^{11}$ bacterias/ml) durante 1 hs a 37°C. Luego se efectuaron cinco lavados sucesivos (3 min. a 8000 r.p.m.) para eliminar el excedente de ^{51}Cr . A continuación la bacterias fueron resuspendidas con solución fisiológica nuevamente a la concentración inicial.

3.1.3.- Obtención de IgG de conejo anti-*Escherichia coli* O111:B4:

El antisuero se obtuvo por inmunización de conejos con *E. coli* O111B:4. El esquema de inmunización consistió en una primera inoculación subcutánea de *E. coli* O111B:4 ($7,2 \times 10^8$ bacterias/100 μl), y tres inoculaciones más, por la misma vía y de la misma concentración a los 20, 30, y 40 días posteriores a la primera inoculación. Siete días después de la última 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) (buffer fosfato 0,01M, pH: 8) (110).

3.1.4.- Preparación del complejo bacteria anticuerpo (EA):

Se realizó la formación del correspondiente complejo inmune: *E. coli*-Anticuerpo (EA), por incubación de la bacteria con la IgG anti-*E. coli*, en concentración subaglutinante, durante media hora a 37°C, siendo lavadas 3 veces (3 min. a 8000 r.p.m.) para eliminar todo el anticuerpo que pudo haber quedado libre, sin formar parte complejo inmune

(CI).

3.1.5.- Estudios de *clearance* de bacteria marcada con ^{51}Cr por el sistema mononuclear fagocítico (SMF):

Los ratones fueron inoculados por vía endovenosa, por inyección en el plexo retro-orbital, de $200\mu\text{l}$ ($1,44 \times 10^{10}$ bacterias/ $200\mu\text{l}$ SF) de *Escherichia coli* O111:B4 formoladas marcadas con ^{51}Cr ($^{51}\text{Cr-E}$), o bien por igual concentración de bacterias sensibilizadas con su anticuerpo específico ($^{51}\text{Cr-EA}$). Este último se preparó de acuerdo a lo especificado anteriormente.

La velocidad de depuración fue determinada por cuantificación de la radioactividad presente en las muestras de sangre, obtenidas en forma seriada, por punción del plexo opuesto con pipeta heparinizada y calibrada ($25\mu\text{l}$). La radioactividad obtenida al minuto de la inoculación de E o EA, fue considerada como el 100% de la marca, a partir de donde se calcularon los porcentajes de marca sucesivos. Para determinar el total de bacteria eliminada (*clearance*) y la distribución de la misma en los distintos órganos del sistema mononuclear fagocítico (SMF), los animales fueron sacrificados a distintos tiempos y se les extrajo: el bazo, los pulmones, el hígado, los riñones y el fémur, determinándose la radioactividad presente en ellos. El número total de cuentas en la médula ósea fue estimado, asumiendo que un sexto del total se encuentra en el fémur. En todos los casos se midió la radioactividad con un contador gamma (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, California), y la captación en los órganos fue expresada como el porcentaje del total de la radioactividad remanente en el momento de la muerte (111). La marca total de $^{51}\text{Cr-E}$ o $^{51}\text{Cr-EA}$ en la sangre en cada tiempo fue derivado de la marca obtenida en la última muestra, siendo multiplicadas por un factor de corrección, considerando que la volemia de un ratón es 0,09 ml/gr. de peso corporal.

3.2.- Formación del complejo bacteria anticuerpo *in vivo*:

3.2.1.- Protocolo de inmunización de ratones con bacteria *E. coli* O111:B4:

Los ratones fueron inmunizados con *E.coli* O111:B4 formoladas, lavadas, y resuspendidas en SF a una con concentración de $1,44 \times 10^{10}$ bacterias/ml. Se realizó el siguiente esquema de inmunización: se inocularon por vía endovenosa, por inyección en el plexo retro-orbital $50\mu\text{l}$ de la suspensión de bacterias. A los 20 días se inoculó una segunda dosis, y la tercera y última, a los 30 días respecto de la primera, inoculándose siempre la misma cantidad de bacteria. Los estudios de *clearance* se llevaron a cabo 50 días después de la primera inoculación, y se respetó el mismo protocolo descripto en la sección anterior. El título de anticuerpos de los animales inmunizados en el momento de ser utilizados fue aglutinante hasta una dilución de 1:10 del anticuerpo, a concentración fija de bacteria ($1,44 \times 10^{10}$ bacterias/ $200\mu\text{l}$).

3.3.- Eliminación del Sistema Complemento:

3.3.1.- Tratamiento con el Factor de Veneno de Cobra (FVC):

Los animales fueron descomplementados por inyección por vía endovenosa de 2 U del Factor de Veneno de Cobra (FVC) (Sigma), 48 hs, 24 hs y media hora antes de realizar los estudios de *clearance*.

3.3.2.- Cuantificación de C3 en suero:

Los niveles de proteína C3 en el suero de los animales controles y los tratados con FVC fue determinado por una inmunodifusión radial en agarosa al 1.5% en PBS, adicionada con α -C3 de ratón hecho en cabra (0.8 mg/ml) (Cappel Lab., Detroit, Michigan). Se sembraron diluciones seriadas de los sueros (volumen final $10\mu\text{l}$), y 18 hs después se compararon los diámetros de los halos de precipitación.

Los niveles de C3 en animales tratados con FVC, medidos al momento de estudio fueron menores del 5% de aquellos obtenidos en sueros de ratones normales.

3.4.- Eliminación de macrófagos *in vivo*:

3.4.1.- Tratamiento con diclorometilendifosfonato encapsulado en liposomas:

Los animales fueron inoculados con 200 μ l de diclorometildifosfonato encapsulado en liposomas (Lip-clod) por vía endovenosa, 48 hs antes de los estudios de *clearance* y sobrevida. Este procedimiento, ha sido ampliamente utilizado en diferentes modelos experimentales (112). El lip-clod fue generosamente provisto por Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany.

3.5.- Bloqueo de los polimorfonucleares (PMNs) por tratamiento con anti Mac-1 (CD11b/CD18) *in vivo*:

Para bloquear la migración de los PMN se utilizó el anticuerpo monoclonal purificado contra CD11b/CD18 (anti Mac-1) (clon M1/70.15, IgG2b de rata contra CD11b), libre de azida, el cual fue generosamente donado por la Dra. Francoise LePault de la Unidad 1461 CNRS URA, Hospital Necker, 161 Sevres 75743, Francia. Para ello se inocularon 25 μ l de anti Mac-1 (2,1 mg/l) por vía endovenosa, por inyección en el plexo retro-orbital, media hora antes de realizar los estudios de *clearance* por inoculación de ^{51}Cr -E o ^{51}Cr -EA.

3.6- Localización celular de la bacteria.

3.6.1.- Marcación de bacteria con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC):

Las bacterias fueron lavadas y resuspendidas en buffer carbonato (1:10, pH: 9,2). Se le agregó en agitación 18 μ l de FITC (Sigma, St. Louis, USA) (18 mg/ml), disuelta en el mismo buffer carbonato, dejándolo en agitación durante un período de dos horas. Posteriormente se realizó una diálisis en 300 ml de SF o PBS, renovando el líquido de diálisis cada 90 min., por un período de 8 hs. Una vez finalizada la diálisis, la bacteria fluoresceinada se lavó 3 veces (3 min. a 8000 r.p.m.) y los distintos experimentos fueron realizados utilizando una concentración de $1,44 \times 10^{10}$ bacterias fluoresceinada/200 μ l (E^F) por animal. Se formó el complejo E^FA tal como se procedió en los casos anteriores. Todos los

experimentos fueron evaluados empleando un citómetro de flujo FACSCAN de Becton Dickinson (Becton Dickinson Immunocytometry System, San José, CA, USA), analizándose no menos de 10.000 eventos y el análisis de los datos se realizó, utilizando el programa Cell Quest (Becton Dickinson).

3.6.2.- Estudios de distribución de PMN en sangre y en pulmón. Cuantificación de la fagocitosis de bacteria fluoresceinada *in vivo*:

Los ratones fueron inoculados con. E^F o E^FA ($1,44 \times 10^{10}$ bacterias/200 μ l) por vía endovenosa. por inyección en el plexo retroorbital. A los 5 min. y a las 3 hs post inyección se trajeron de cada grupo 200 μ l de sangre, obtenida por punción del plexo opuesto con pipeta heparinizada. A las 3 hs los animales fueron sacrificados y se les trajeron los pulmones y/o el bazo y el hígado, según el experimento efectuado.

La sangre obtenida, fue diluida al medio con SF. Luego se agregó dextrán al 6%, en una proporción de tres volúmenes de suspensión celular a un volumen de dextrán. Se dejó sedimentar durante 1 hs a temperatura ambiente, se recogió el sobrenadante rico en leucocitos. Los eritrocitos contaminantes fueron eliminados por shock osmótico con agua destilada durante 1 min., restituyéndose inmediatamente la isotonicidad con SF 10X. Se lavó con PBS (2 veces, 1200 r.p.m., por 10 min.), y los leucocitos fueron resuspendidas en 300 μ l de Isoflow (International Link S.A., Buenos Aires, Argentina). Los pulmones, los hígados y los bazos fueron desmenuzados cuidadosamente con tijeras y pasados a través de una malla fina de acero inoxidable. Las células obtenidas fueron lavadas y sembradas en 1 ml de dextrán 6%, cada 2 ml de suspensión celular. A continuación se siguió el mismo procedimiento que con las muestras de sangre. Finalmente se tomaron 10 μ l de las muestras de cada órgano y se resuspendieron en 300 μ l de Isoflow. Se evaluó el % de PMN y el % de fagocitosis por citometría de flujo en todas las muestras obtenidas.

4.- Estudios *in vitro*:

4.1.- Cuantificación de la fagocitosis en sangre entera *in vitro*:

Se tomaron muestras de sangre periférica (200 μ l), de animales normales, extraídas por punción del plexo retro-orbital con pipeta heparinizada, y se incubaron a 37°C durante 15 min. en agitación con $2,7 \times 10^9$ bacterias/15 μ l de E^F o E^{FA}. Las muestras fueron lavadas a 1000 r.p.m. por 10 min. con PBS. Se descartó el sobrenadante y se efectuó un shock osmótico con agua destilada, llevándose rápidamente a isotonicidad con PBS 10X. Las muestras fueron divididas en dos grupos, y a una mitad se le efectuó un tratamiento ácido con el objeto de determinar si las bacterias estaban siendo fagocitadas o simplemente adheridas a la superficie de las células fagocíticas. Para ello a las suspensiones celulares se les agregó 100 μ l de una solución HCl/Glicina 0,1M, en agitación por 20 segundos. A continuación las muestras fueron centrifugadas. Por último todas las muestras fueron lavadas y se resuspendieron en 300 μ l de Isoflow. Los resultados se evaluaron por citometría de flujo, cuantificándose el porcentaje de polimorfonucleares que hubieran incorporado E^F o E^{FA} y la intensidad media de fluorescencia.

4.2.- Medición de TNF- α :

Se tomaron muestras de sangre de animales tratados con $1,44 \times 10^{10}$ bacterias/200 μ l de E o EA, a distintos tiempos p.i. Se recuperaron los sueros y se evaluó la actividad de TNF- α , mediante la técnica de sensibilidad a TNF- α de la línea celular fibroblástica murina L-929, descripta por Wang *et al.* (113). Brevemente, Se sembró una suspensión de 3×10^5 de células L-929/100 μ l en una placa de cultivo de 96 pozos (Corning, NY). Estas fueron incubadas por 18 hs. a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, período en el cual las células crecen hasta formar una monocapa. Las células semiconfluentes fueron incubadas con 100 μ l de las muestras a testear, sembrando diluciones seriadas de las mismas, en presencia de actinomicina-D (1 ug/ml). Se utilizó el suero de un animal normal como control negativo. Paralelamente se llevó una curva control TNF- α murino recombinante, partiendo de una concentración de 5 mg/ml y haciendo diluciones seriadas al medio. Luego de 18 horas de incubación, las placas se lavaron dos veces con PBS tibio y se removió las células

muertas. Las células L-929 viables fueron fijadas con metanol al 20%, y teñidas con una solución de cristal violeta al 0.05%, durante 10 min. Transcurrido dicho tiempo las placas fueron lavadas con agua fría y se les adicionó ácido acético al 33%. Las placas fueron leídas, en un lector de Elisa (Anthos 2001, Organon Tecnika, Buenos Aires, Argentina) a 550 nm. El título de TNF- α fue determinado en cada muestra como la inversa de la dilución para el 50% de citotoxicidad (U/ml).

4.3.- Medición de Mieloperoxidasa (MPO):

La MPO es una enzima presente en los gránulos primarios de los PMNs que juegan un papel central en la actividad microbicida. En presencia de H_2O_2 la MPO oxida a un número de sustratos, incluyendo la *o*-dianisidina, *o*-phenylendiamina, y 4-aminoantipirina. El cambio de color resultante del sustrato puede ser medida espectrofotométricamente y ser utilizada por lo tanto, para cuantificar la actividad MPO (114).

Los ratones fueron inoculados con (1.44×10^{10} bacterias/200 μ l) E o EA por vía endovenosa por inyección en el plexo retro-orbital. A las 3 hs p.i. se tomaron muestras de 200 μ l de sangre obtenidas por punción del plexo opuesto con pipeta heparinizada. Los eritrocitos fueron lisados realizando un shock osmótico con agua destilada (1 min.) restituyéndose la isotonicidad con SF 10X. Posteriormente los animales fueron sacrificados y se les extrajo el hígado y los pulmones que fueron desmenuzados cuidadosamente con tijeras, y luego pasados a través de una malla fina de acero inoxidable. Las suspensiones celulares fueron lavadas (2 veces a 2000 r.p.m. por 10 min.) con buffer PBS:Ca⁺⁺/Mg⁺⁺, los hígados se resuspendieron en 2 ml del buffer, los pulmones en 1 ml y la sangre también en 1 ml del buffer. La células fueron lisadas por congelamiento a -70°C durante 24 hs. Luego fueron tratadas con Tritón X-100 al 2% a 37°C por 30 min., en agitación constante, con el objeto de desorganizar las membranas celulares de las vesículas lisosomales y facilitar la liberación de las enzimas contenidas en estas. A continuación las suspensiones celulares fueron centrifugadas 5 min. a 2000 r.p.m. recuperándose el sobrenadante, a efectos de ser utilizado en la medición de MPO. Para ello se sembraron en placas de 96 pozos, 50 μ l del sobrenadante

(en medio PBS:Ca⁺⁺/Mg⁺⁺) con 100 μ l de una solución reveladora, incubándose por un período de 15 min. La reacción se detuvo por el agregado de 100 μ l de solución H₂SO₄ 4N. Se leyó en un contador ELISA a 490 nm (Amthos 2001, Organon Teknika, Buenos Aires, Argentina). El contenido de MPO se expresa como cambios en la Absorbancia a 490 nm (MPO Δ 490_{nm})

5.- Estudios de histopatología:

Se realizaron estudios de histopatología en animales pretratados con Cl₂MDP o SF y las 48 hs. p.i., inoculados con bacteria (E) o con bacteria-anticuerpo (EA). A las 3 hs p.i, los animales fueron sacrificados y se extrajeron los pulmones, el hígado, el bazo y los riñones, fijándolos en buffer formaldehído al 10% en PBS (pH: 7,4). Los cortes histológicos (3-5 μ m) de los órganos en evaluación, fueron embebidos en parafina y teñidos posteriormente con la técnica de hematoxilina y eosina. Se evaluaron tres animales por grupo.

6.- Análisis estadístico de los datos.

Todos los datos son presentados como la media del error standard (MES). Las comparaciones entre los múltiples grupos fueron realizadas por el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido de un test de *t* de Bonferroni. Los valores de P<0,05 fueron considerados significativamente diferentes.

D.- RESULTADOS

La depuración de antígenos es una de las funciones centrales del sistema mononuclear fagocítico (SMF). Esta acción se realiza aceleradamente cuando el antígeno forma parte de complejos inmunes (CI). La captura e ingestión de esos CI por las células del SMF se lleva a cabo en forma activa a través de los receptores para la porción Fc de IgG (FcγR) presentes en las membranas de las células fagocíticas.

Considerando que durante el curso de una infección con gérmenes gram negativos hay liberación de grandes cantidades de LPS (una bacteria posee $3,5 \times 10^6$ moléculas de LPS, (115), y que nuestros resultados previos indican que los LPS bacterianos (de *E. coli* O111:B4) tienen la capacidad de acelerar la depuración (*clearance*) de complejos inmunes particulados formados por eritrocitos singeneicos y anticuerpos específicos, a través de los FcγR (116), creemos necesario analizar exhaustivamente los mecanismos involucrados en la depuración de bacterias Gram negativas siendo este esquema experimental mas representativo de lo que ocurre durante una infección.

Por tanto, analizaremos en un modelo de ratón el *clearance* de *Escherichia coli* O111:B4, sola o formando parte de un complejo inmune.

1.- Estudios de Clearance de Escherichia coli O111:B4:

1.1.- Cinética de eliminación de *Escherichia coli* O111:B4:

La capacidad depuradora del SMF, se analizó midiendo la velocidad de *clearance* de *E. coli* O111B:4 (E) formoladas y *E. coli* O111B:4 sensibilizadas con anticuerpos específicos del tipo IgG (EA). Para ello las bacterias se marcaron con ^{51}Cr ($^{51}\text{Cr-E}$), y en el caso de los complejos inmunes, los mismos se formaron incubándose la bacteria marcada con igual volumen de anticuerpo en concentración subaglutinante, durante 30 min. a 37°C ($^{51}\text{Cr-EA}$). Las bacterias ($^{51}\text{Cr-E}$ o $^{51}\text{Cr-EA}$) fueron posteriormente lavadas e inoculadas por vía endovenosa ($1,4 \times 10^{10}$ bacterias/200μl) en ratones BALB/c, de acuerdo a lo descripto en Materiales y Métodos. A continuación se tomaron muestras de sangre en forma seriada y se

contó la radioactividad presente en un contador gamma, calculándose la velocidad de *clearance* a partir de la desaparición del ^{51}Cr circulante en las muestras sucesivas.

A través de estos estudios se determinó que los animales eliminan el 65% de las bacterias en los primeros 15 min. El porcentaje de ^{51}Cr circulante disminuye hasta las 24 hs. donde solo queda en circulación un 6% del total inoculado. A las 48 hs. el % ^{51}Cr en circulación es prácticamente el mismo: $^{51}\text{Cr-E}$: (9 \pm 2).

Al inocular el complejo bacteria-anticuerpo, en cambio, en los primeros 15 min se elimina de la circulación el 90% de la radioactividad total inoculada, porcentaje que se mantiene hasta las 48 hs. % ^{51}Cr en circulación para: $^{51}\text{Cr-EA}$: (11 \pm 1), (*Figura 1*).

Como puede observarse el complejo bacteria-anticuerpo es eliminado de circulación con mayor velocidad que la bacteria sola. El porcentaje de marca presente en sangre es significativamente diferente entre ambos grupos, hasta las 3 hs. p.i.

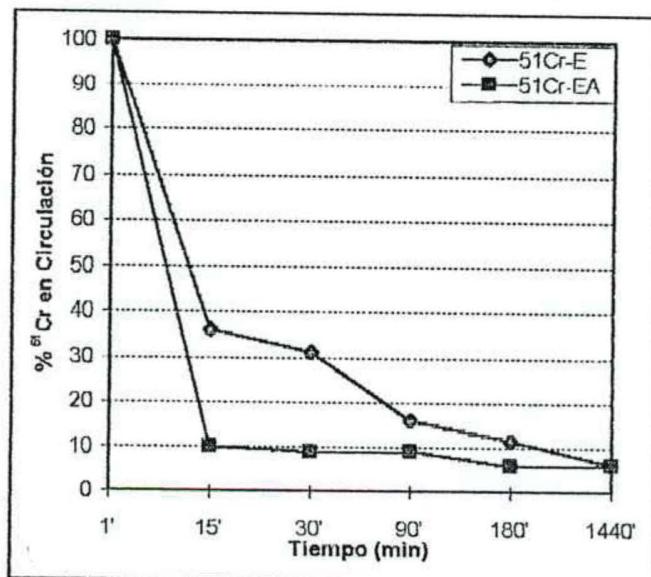


FIGURA 1: Velocidad de *clearance* en animales inoculados con bacteria $^{51}\text{Cr-E}$, o bacteria-anticuerpo, $^{51}\text{Cr-EA}$.

Animales inoculados con 1.4×10^{10} bacterias/200 μl de $^{51}\text{Cr-E}$ o $^{51}\text{Cr-EA}$, por vía endovenosa por inyección en el plexo retro-orbital, fueron sangrados al minuto y a los 15, 30, 90, 180 y 1440 minutos p.i, por punción del plexo opuesto.

Se evaluó el porcentaje de ^{51}Cr circulante en un contador gamma.

Cada punto representa el % de radioactividad presente en cada muestra de sangre, considerando la marca al minuto como el 100% del inoculo (X \pm ES; n= 6). * p < 0.024 comparado con E., *** p < 0.0001 comparado con E, según el test de Student.

1.2.- Cinética de la distribución de *Escherichia coli* O111:B4 en los distintos órganos:

Dado los resultados obtenidos en la evaluación de la velocidad de *clearance* se decidió analizar la capacidad de los órganos relacionados con el SMF de captar bacterias inactivadas o bacteria-anticuerpo. Para ello se inocularon ratones por vía endovenosa con bacterias marcadas con ^{51}Cr o complejo bacteria-anticuerpo, $^{51}\text{Cr-E}$, $^{51}\text{Cr-EA}$, procediéndose de la misma manera que explicada anteriormente. A lo largo de 24 hs, y a diferentes tiempos, se tomaron muestras de sangre y se sacrificaron los animales tratados de los que se extrajeron los siguientes órganos: el hígado, los pulmones, los riñones, el bazo, y el fémur, considerando que este contiene un sexto del total de la médula ósea. La marca total remanente para cada tiempo, se determinó sumando la radioactividad presente en los distintos órganos evaluados incluyendo la muestra de sangre y corresponde al 100% de la marca. A partir de este valor se calculó el porcentaje de captación de cada órgano.

Así podemos observar en la *Figura 2* que a las 24 hs. post inoculación de bacteria $^{51}\text{Cr-E}$, o de bacteria-anticuerpo $^{51}\text{Cr-EA}$, la marca se localiza fundamentalmente en el hígado en ambos grupos y solo un pequeño porcentaje de la misma se distribuye entre el bazo, el fémur, los riñones los pulmones y la sangre. A las 24 hs, no existen diferencias significativas en el porcentaje de captación encontrado de los órganos examinados, entre ambos grupos.

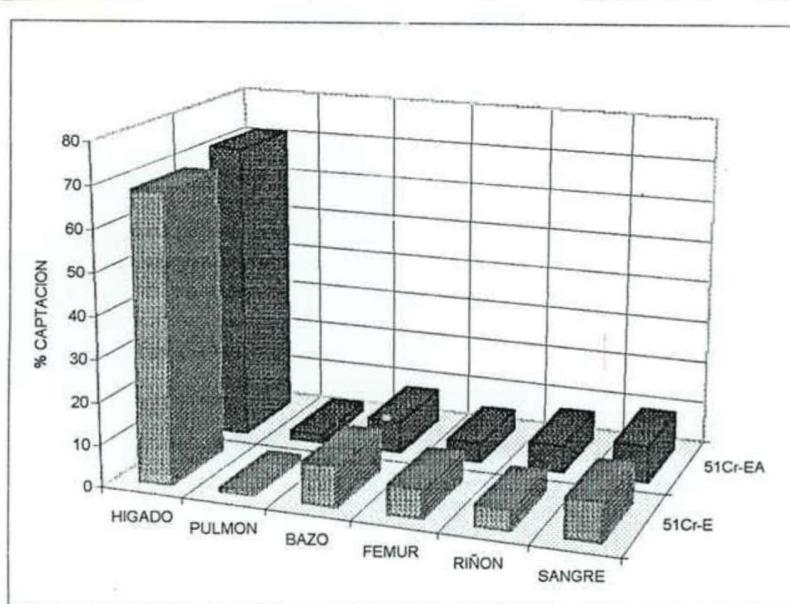


FIGURA 2: Distribución de la marca en órganos a las 24 hs. p.i.

A las 24 hs post inyección de 1.4×10^{10} bacterias/200 μ l de $^{51}\text{Cr-E}$ o $^{51}\text{Cr-EA}$ los animales fueron

sangrados y sacrificados y se les extrajo los pulmones, el hígado, el bazo, los riñones, el fémur.

Cada barra representa el % de radioactividad presente en cada órgano ($\bar{X} \pm \text{ES}$; $n=6$).

No se encontraron diferencias significativas entre grupos en este tiempo.

Al estudiar la cinética en el hígado a lo largo de 24 hs p.i., se puede observar que la captación de bacterias y de bacteria-anticuerpo aumenta durante las primeras 24 hs. alcanzando en ambos casos aproximadamente el 70% de la marca total inoculada, sin encontrarse diferencias significativas sobre el nivel de captación entre ambos grupos (*Figura 3*). Recién a las 48 hs. p.i. se observa en el grupo tratado con $^{51}\text{Cr-EA}$ un pequeño, pero significativo descenso en el nivel de radioactividad. El % Captación en hígado a las 48 hs fue: $^{51}\text{Cr-E}$: 67.8 ± 4 ; $^{51}\text{Cr-EA}$: 48.5 ± 4 ; ($n=2$, $p < 0.07$).

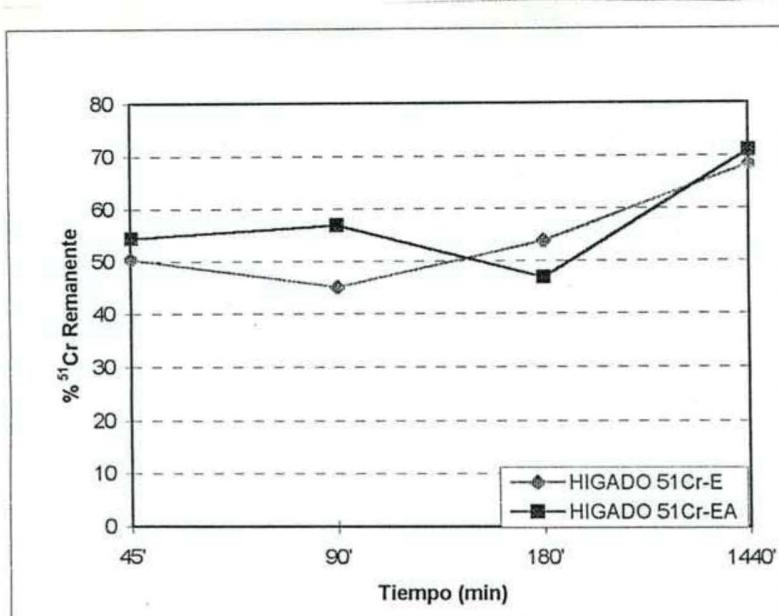


FIGURA 3: Cinética del *clearance* en hígado a lo largo de 24 hs p.i.

A distintos tiempos luego de la inoculación de 1.4×10^{10} bacterias/200 μ l de ^{51}Cr -E o ^{51}Cr -EA, se extrajo el hígado de cada animal y se midió la radioactividad presente.

Los datos se expresan como porcentaje de captación respecto al total remanente, en función del tiempo. Cada punto representa la media \pm ES de por lo menos 6 animales.

No se encontraron diferencias significativas entre grupos.

El bazo del grupo inoculado con bacteria capta en los primeros 45 min. aproximadamente un 13% respecto de la marca inoculada, este porcentaje aumenta significativamente hasta las 3 hs. p.i., para luego descender lentamente hasta las 24 hs. p.i donde se observa un 9% de radioactividad. Cuando los ratones fueron inoculados con complejos inmunes, este órgano capta un 50% menos que cuando las bacterias están solas, y la marca aumenta apenas perceptiblemente a lo largo de las 24 hs. Entre ambos grupos existen, diferencias significativas en los niveles de captación observados a lo largo de las 24 hs, (*Figura 4*).

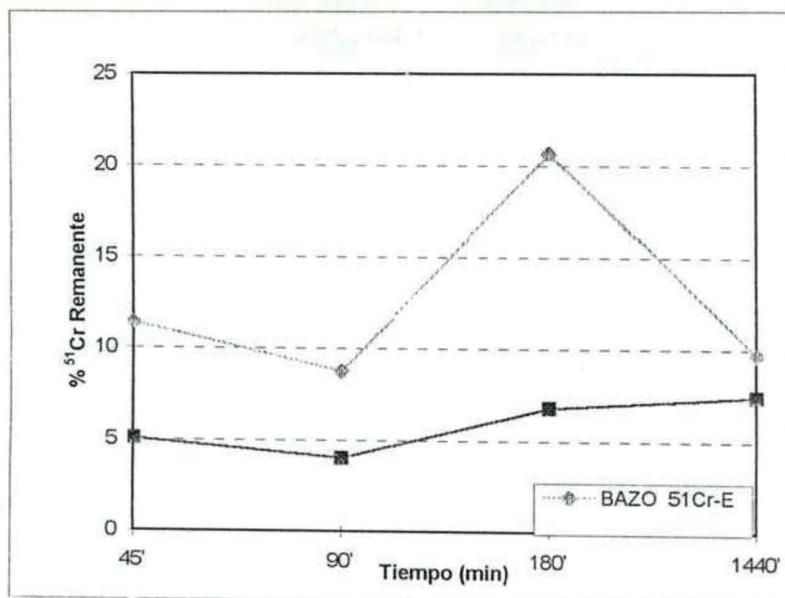


FIGURA 4: Cinética del *clearance* en bazo, a lo largo de 24 hs. p.i.

A distintos tiempos luego de la inoculación de 1.4×10^{10} bacterias/200 μl de ^{51}Cr -E o ^{51}Cr -EA se extrajo el bazo de cada animal y se midió la radioactividad presente a cada tiempo.

Los datos se expresan como porcentaje de captación respecto al total remanente, en función del tiempo. Cada punto representa la media \pm ES de por lo menos 6 animales.

A partir de los 45 min. post inyección pueden observarse diferencias significativas:

* $p < 0.013$ comparado con E.

** $p < 0.095$ comparado con E, según el test de Student.

Al estudiar la cinética en pulmón, se observó que el grupo tratado con bacteria ^{51}Cr -E., presenta un porcentaje de captación a tiempos cortos (45 min.), de aproximadamente el 15 por ciento de la marca total inoculada y esta disminuye a lo largo de las horas hasta desaparecer por completo a las 24 hs. *Figura 5*.

Cuando los ratones fueron inoculados con bacterias sensibilizadas con anticuerpo(^{51}Cr -EA), este órgano es capaz de captar a los 45 min. hasta un 27% de la marca total inoculada. En los tiempos sucesivos la marca va disminuyendo significativamente, hasta las 24 hs p.i, en el que es prácticamente despreciable. Es de destacar que en todos los tiempos analizados la captación de EA en el pulmón es significativamente mayor que la de E.

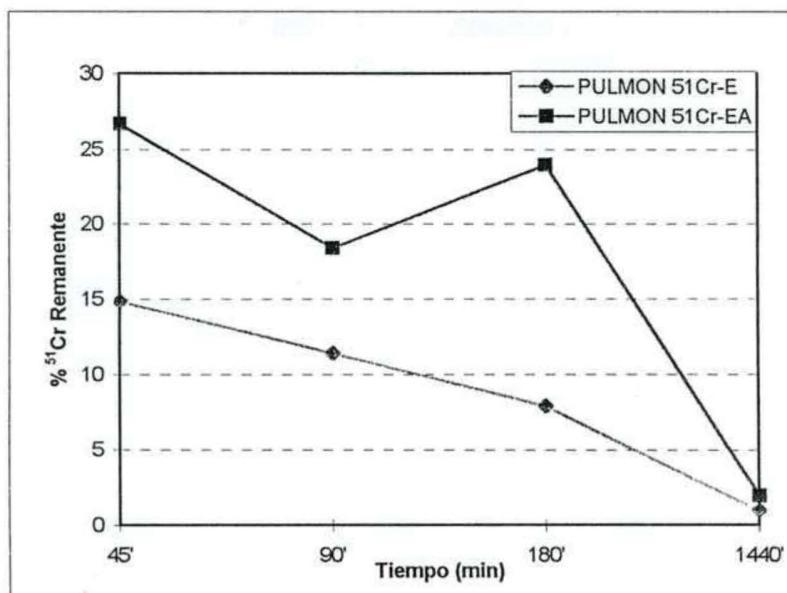


FIGURA 5: Cinética de *clearance* en pulmón a lo largo de 24 hs. p.i.

A distintos tiempos luego de la inoculación de 1.4×10^{10} bacterias/200 μ l de ⁵¹Cr-E o ⁵¹Cr-EA se extrajeron los pulmones de cada animal y se midió la radioactividad presente a cada tiempo.

Los datos se expresan como porcentaje de captación respecto al total remanente, en función del tiempo. Cada punto representa la media \pm ES de por lo menos 6 animales.

A partir de las 3 hs p.i pueden observarse diferencias significativas; ** p < 0.0094 comparado con E, según el test de Student.

Es importante resaltar que a las 3 hs p.i se observan en el bazo y los pulmones, diferencias muy significativas en el porcentaje de captación según los animales hayan sido inoculados con E o EA. La marca presente en el pulmón es claramente superior cuando se trata con complejo bacteria-anticuerpo, que con bacterias solas, y esto ocurriría a expensas de una considerable disminución de la captación en el bazo. Al mismo tiempo, el tratamiento con bacteria induciría el efecto inverso.

Cuando se evaluó la captación en hígado, riñón y fémur, no se encontraron diferencias significativas a lo largo del período de estudio, entre los tratamientos realizados (E o EA).

Esta diferencia en el sitio atrapamiento de la bacteria según se encuentre en ausencia o presencia de anticuerpos específicos y la diferencia en la eficiencia de eliminación en cada órgano puede ser importante para la evolución de un proceso bacteriano infeccioso.

Dado que a las 3 hs. p.i., se observan las mayores diferencias en el

procesamiento de la bacteria o bacteria-anticuerpo, respecto a la distribución en los distintos órganos, se estudió el *clearance* a tiempos más cortos. Se analizó la distribución en los distintos órganos a las 3 hs. p.i.

Tal como puede observarse en la *Figura 6* encontramos que efectivamente aquellos animales inoculados con E muestran una captación significativamente mayor en el bazo que los inoculados con EA; por el contrario los animales inoculados con EA muestran un mayor atrapamiento en el pulmón. Es decir que, dependiendo de la forma en que es presentado el antígeno, el bazo o el pulmón se destacan en la capacidad para atraparlo. Por el contrario, en el hígado, la médula ósea, y los riñones no se encontraron diferencias significativas entre grupos.

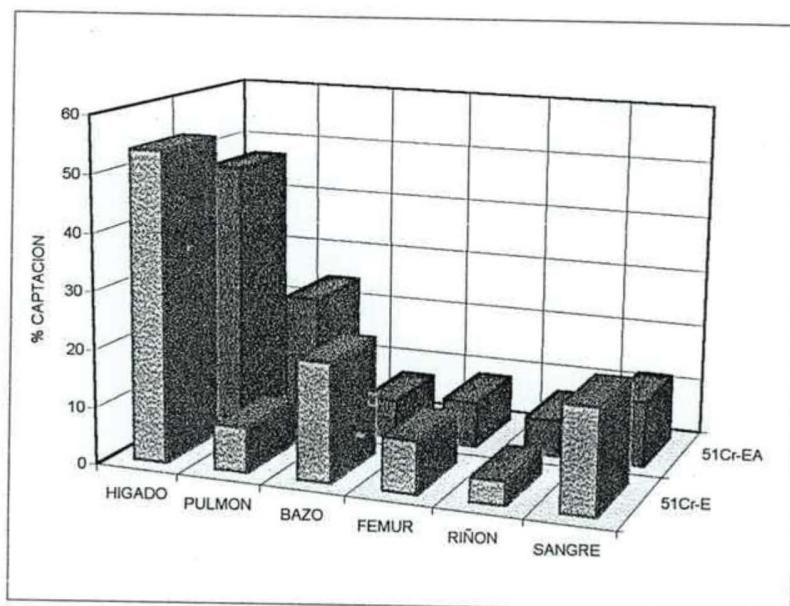


FIGURA 6: Distribución de la marca en órganos, a las 3 hs. p.i.

A las 3 hs post inyección de 1.4×10^{10} bacterias/200 μ l de ^{51}Cr -E o ^{51}Cr -EA los animales fueron sangrados y sacrificados y se les extrajo los distintos órganos.

Cada barra representa la media de radioactividad presente en cada órgano \pm ES de 6 animales., * $p < 0.057$ comparado con E., ** $p < 0.0094$ comparado con E. , ** $p < 0.095$ comparado con E, según el test de Student.

1.3.- Formación del complejo inmune EA *in vivo*:

Con el fin de determinar si la formación del complejo inmune bacteri-anticuerpo *in vivo* era capaz de reproducir los efectos encontrados cuando el complejo es formado *in vitro*, se efectuó el protocolo de inmunización, por inoculación e.v. de *E. coli* O111:B4 según lo indicado en Materiales y Métodos. Cuando los animales presentaron un título de anticuerpos anti-*E. coli* aglutinante (de hasta una dilución 1:10 del anticuerpo, a concentraciones fija de bacteria), se efectuó el *clearance* por inoculación de ^{51}Cr -E. Se realizaron sangrados seriados hasta las 3 hs. p.i. y en este tiempo los animales fueron sacrificados extrayéndose los pulmones, el hígado, el bazo, los riñones y el fémur.

Las *Figuras 7a y 7b*, nos muestran que la velocidad de *clearance* y la distribución en los órganos evaluados reproducen los resultados vistos anteriormente, cuando el complejo era formado *in vitro*. Las diferencias encontradas en ambos parámetros fueron mucho más pronunciadas, y extremadamente significativas, comparando los resultados vistos en animales inmunizados e inoculados con bacterias, y controles sin inmunizar.

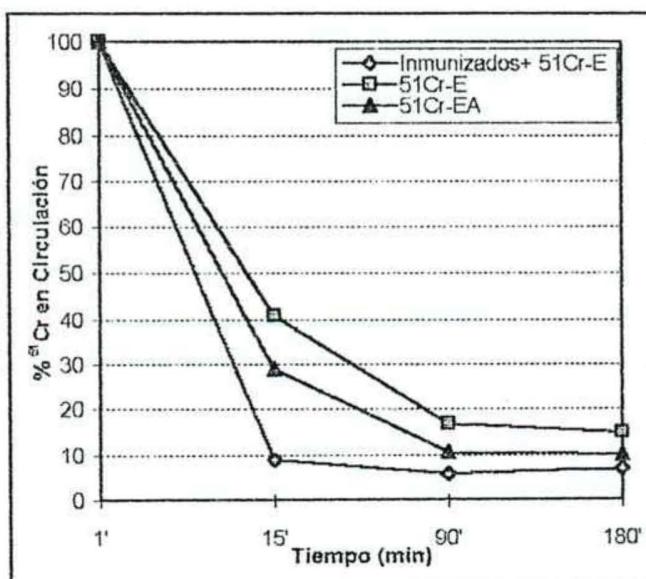


FIGURA 7a: Velocidad *clearance* en sangre en animales inmunizados.

Animales inmunizados e inoculados con 1.4×10^{10} bacterias/200 μl de ^{51}Cr -E y normales tratados con ^{51}Cr -E o ^{51}Cr -EA, fueron sangrados al minuto y a los 15, 90, 180 minutos p.i.

Se evaluó el porcentaje de ^{51}Cr circulante en un contador gamma.

Cada punto representa el % de radioactividad presente respecto a la muestra tomada al minuto, (X \pm ES; n= 6.), •• p< 0.004 comparando los inmunizados con E

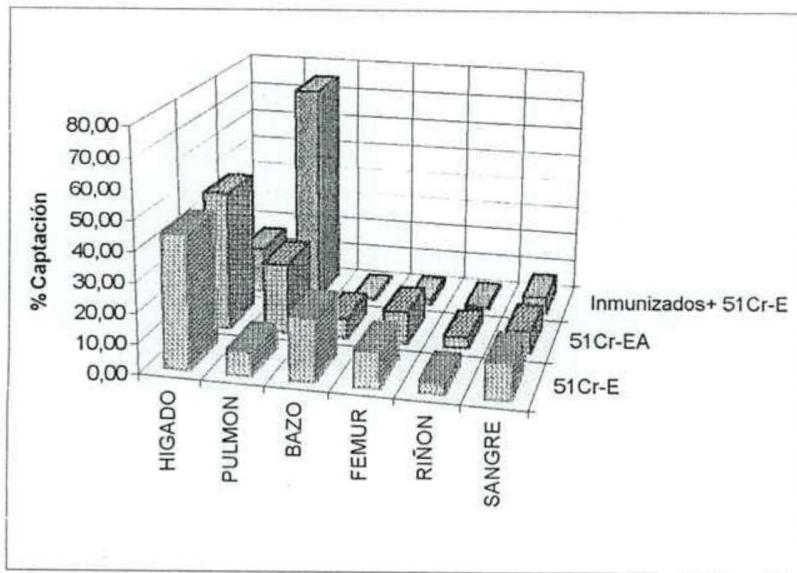


FIGURA 7b: Distribución de la marca en órganos en animales inmunizados a las 3 hs. p.i.

Animales inmunizados e inoculados con 1.4×10^{10} bacterias/200 μ l de ^{51}Cr -E y normales tratados con ^{51}Cr -E o ^{51}Cr -EA fueron sangrados y sacrificados y se les extrajo los distintos órganos a las 3 hs post inoculación.

Cada barra representa la media del porcentaje de radioactividad presente en cada órgano \pm ES de 6 animales., *** $p < 0.0001$ comparando inmunizados vs EA., *** $p < 0.0001$ comparando inmunizados vs E., ** $p < 0.004$ comparando inmunizados vs E., * $p < 0.03$ comparando EA vs E.

2.- Participación del Sistema Complemento:

El sistema complemento está constituido por proteínas séricas, que pueden ser activadas por complejos antígeno-anticuerpo (C1) o microorganismos, experimentando una cascada de reacciones proteolíticas cuyo final resulta en el ensamblaje de un complejo de ataque a membrana. Dichos complejos pueden lisar microorganismos. Al mismo tiempo, los fragmentos proteolíticos liberados durante el proceso de activación, promueven la respuesta de defensa por dilatación de los vasos sanguíneos y quimiotaxis de células fagocíticas al sitio de infección. El complemento también incrementa la capacidad de las células fagocíticas para adherirse, ingerir y destruir los microorganismos que están siendo atacados (117).

La vía clásica, se inicia por la unión y posterior activación de C1 a un complejo antígeno-anticuerpo (118). Esta es normalmente activada por anticuerpos IgG o IgM que estén

pegados a la superficie de un microorganismo. Sin embargo, está claramente establecido que en ausencia de complejos antígeno-anticuerpo, los lipopolisacáridos (LPS) presentes en bacterias pueden activar el C3 (por la vía alterna) y disparar el complejo de ataque lítico.

2.1.- Participación del complemento en la eliminación de antígenos particulados:

Se sabe que las células sensibilizadas con anticuerpos fijadores de complemento son eliminados de la circulación principalmente a través del hígado y que aquellos sensibilizados por anticuerpos no fijadores de complemento son depurados predominantemente por el bazo (69). En este contexto, se decidió eliminar el sistema complemento por inoculación de dosis seriadas de Factor anti complementario del Veneno de Cobra (FVC) con el objeto de estudiar el papel del sistema complemento y su influencia en el *clearance* de *E. coli* sola o formando parte de un CI. Las bacterias fueron preparadas para los experimentos de clearance tal como se describió en los puntos anteriores, inoculándose ratones con ^{51}Cr -E o ^{51}Cr -EA por vía endovenosa. Se tomaron muestras seriadas de sangre hasta las tres horas p.i. tiempo en el cual los animales fueron sacrificados y se midió la radioactividad presente en los pulmones, el hígado, el bazo, los riñones y el fémur.

De los estudios de la velocidad de *clearance* en los animales descomplementados podemos observar en la *Figura 8a* que, la eliminación del sistema complemento retarda muy significativamente el *clearance* de bacteria en sangre durante los primeros 90 min. p.i., respecto del control (sin descomplementar e inoculado con bacterias). A partir de este tiempo, el porcentaje de marca en sangre disminuye estabilizándose y manteniéndose constante hasta las 3 hs. presentando en este tiempo también diferencias significativas entre ambos grupos.

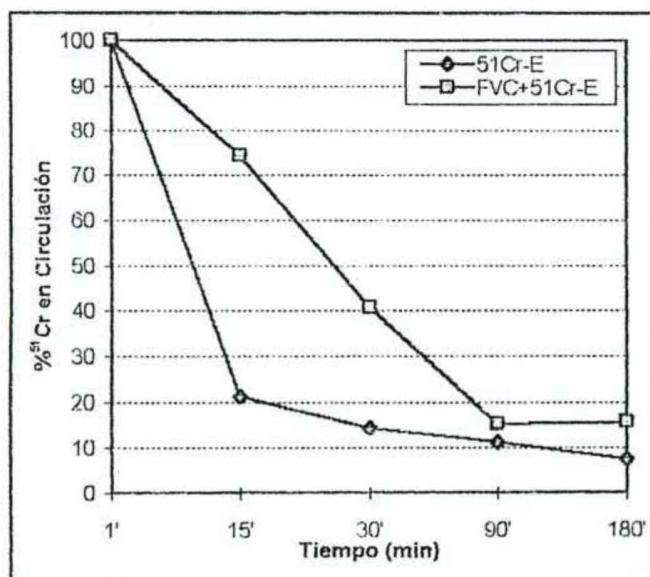


FIGURA 8a: Velocidad de *clearance* en animales descomplementados e inculados con ^{51}Cr -E.

Animales tratados con FVC e inculados con 1.4×10^{10} bacterias/200 μl de ^{51}Cr -E y normales tratados solo con ^{51}Cr -E, fueron sangrados al minuto y a los 15, 30, 90, 180 minutos p.i.

Se evaluó el porcentaje de ^{51}Cr circulante en un contador gamma.

Cada punto representa el % medio de radioactividad presente ($\bar{X} \pm \text{ES}$; $n=3$).

A las 3 hs. p.i. se encontraron diferencias significativas., ** $p < 0.06$ comparando FVC+E con E, según el test de Student.

En la *Figura 8b* puede observarse que los animales descomplementados e inculados con EA, solo presentan un leve retraso en el *clearance* a los 15 min. p.i. pero luego el mismo se lleva a cabo alcanzando los mismos valores que el grupo sin descomplementar.

La velocidad de depuración de bacteria se ve significativamente retrasada por la eliminación del sistema complemento, mientras que el *clearance* del complejo bacteria-anticuerpo, solo se afecta parcialmente.

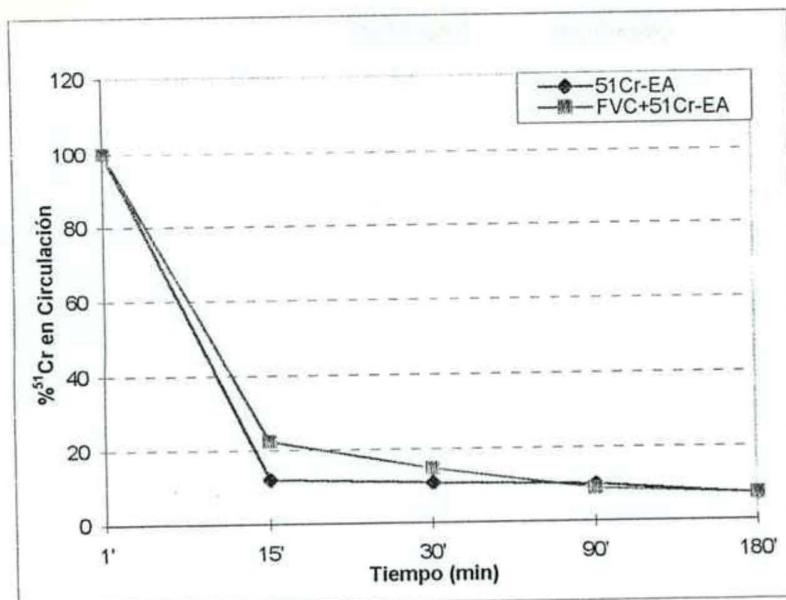


FIGURA 8b: Velocidad de *clearance* en sangre de animales descomplementados e inoculados con ^{51}Cr -EA.

Animales tratados con FVC e inoculados con 1.4×10^{10} bacterias/200 μl de ^{51}Cr -EA y normales tratados solo con ^{51}Cr -EA fueron sangrados al minuto y a los 15, 30, 90, 180 minutos p.i.

Se evaluó el porcentaje de ^{51}Cr circulante en un contador gamma.

Cada punto representa la media del % de radioactividad presente \pm ES de 3 animales.

No se encontraron diferencias significativas a lo largo de todo el período de estudio.

A continuación se analizaron los efectos de la eliminación del sistema complemento en la distribución de la marca en los distintos órganos donde participa el SMF.

Los animales descomplementados con (FVC) e inoculados con bacteria ^{51}Cr -E, mostraron una clara disminución de la radioactividad encontrada en el hígado a expensas de un aumento levemente significativo en los pulmones, y un incremento muy significativo de la marca presente en sangre que no es depurada de la circulación, respecto al control con ^{51}Cr -E (sin FVC). En los riñones, fémur y el bazo, no hubo diferencias significativas por el tratamiento (*Figura 9a*).

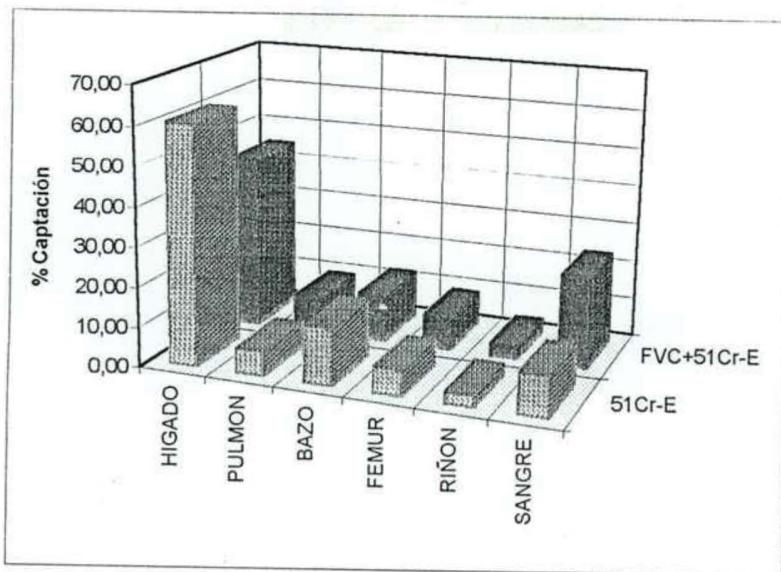


FIGURA 9a: Distribución de la marca en órganos a las 3 hs. p.i., en animales descomplementados e inoculados con ^{51}Cr -E.

Animales tratados con FVC e inoculados con 1.4×10^{10} bacterias/200 μl de ^{51}Cr -E y controles sin FVC fueron sangrados y sacrificados y se les extrajo los distintos órganos a las 3 hs post inoculación.

Cada barra representa la media del % de radioactividad presente en cada órgano \pm ES de 3 animales.

• $p < 0.06$ comparando FVC+E con E, •• $p < 0.006$ comparando FVC+E con E, según el test de Student.

Los animales descomplementados e inoculados con ^{51}Cr -EA, mostraron un comportamiento diferente respecto a los de ^{51}Cr -E, donde la captación en el hígado no se altera por la falta de complemento, manteniéndose en los mismos niveles que los controles sin descomplementar. Sin embargo los pulmones presentaron un porcentaje de marca significativamente menor respecto de los controles, que fue compensado por un aumento muy significativo de la marca en bazo. Tanto en la sangre como el resto de los órganos estudiados, no se observaron diferencias significativas respecto a los controles (*Figura 9b*).

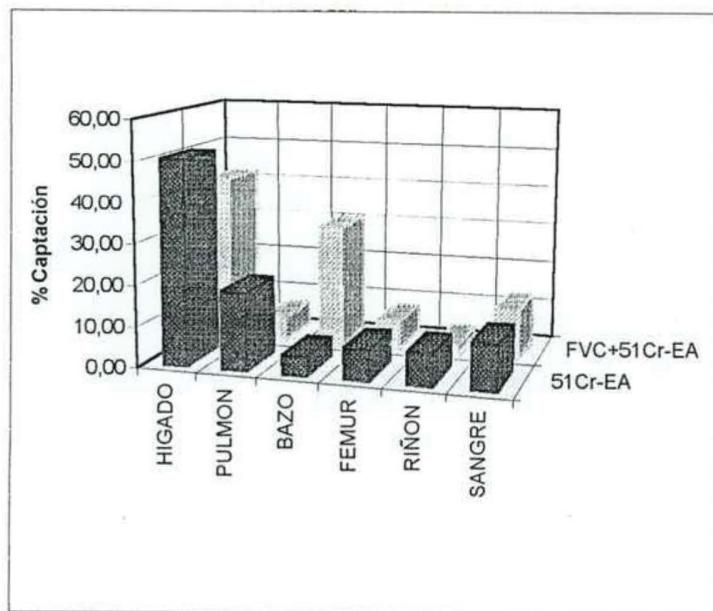


FIGURA 9b: Distribución de la marca en órganos a las 3 hs. p.i., en animales descomplementados e inoculados con ^{51}Cr -EA vs ^{51}Cr -EA.

Animales tratados con FVC e inoculados con 1.4×10^{10} bacterias/200 μl de ^{51}Cr -EA y controles sin FVC fueron sangrados y sacrificados y se les extrajo los distintos órganos a las 3 hs post inoculación.

Cada barra representa la media del % de radioactividad presente en cada órgano \pm ES de 3 animales.

* $p < 0.013$ comparando FVC+EA con EA, ** $p < 0.003$ comparando FVC+EA con EA, según el test de Student.

De estos experimentos se desprende que la activación del sistema complemento ejerce una clara influencia sobre el sitio de atrapamiento del antígeno inoculado.

3.- Participación de los macrófagos en el clearance de *Escherichia coli* O111:B4:

3.1.- Eliminación *in vivo* del sistema mononuclear fagocítico (SMF):

3.1.2.- Bloqueo de Macrófagos *in vivo* con Diclorometilen Difosfonato encapsulado en liposomas (Lip-clod):

Con el objetivo de determinar el grado de participación de los MØ en el clearance de E o EA, se llevó a cabo la eliminación hepática y esplénica de la población macrofágica, utilizando para ello liposomas conteniendo difosfonato diclorometileno encapsulado en liposomas (Lip-clod) según fue descripto en Materiales y Métodos. El lip-clod

fue inoculado por vía endovenosa, 48 hs. antes de los estudios de *clearance*. La dosis utilizada induce la eliminación total de los macrófagos presentes en hígado (células de Kupffer) y bazo.

Observando la *Figura 10a*, se puede establecer que el tratamiento con lip-clod disminuye significativamente la velocidad de *clearance* de la bacteria a lo largo de todo el período de estudio. En la *Figura 10b*, podemos ver, en cambio, que la velocidad de *clearance* cuando se inyectó bacteria-anticuerpo es menor respecto del control solo en los primeros 45 min., pero luego alcanza los valores del grupo control, manteniéndose así hasta las 3 hs, sin presentar diferencias significativas.

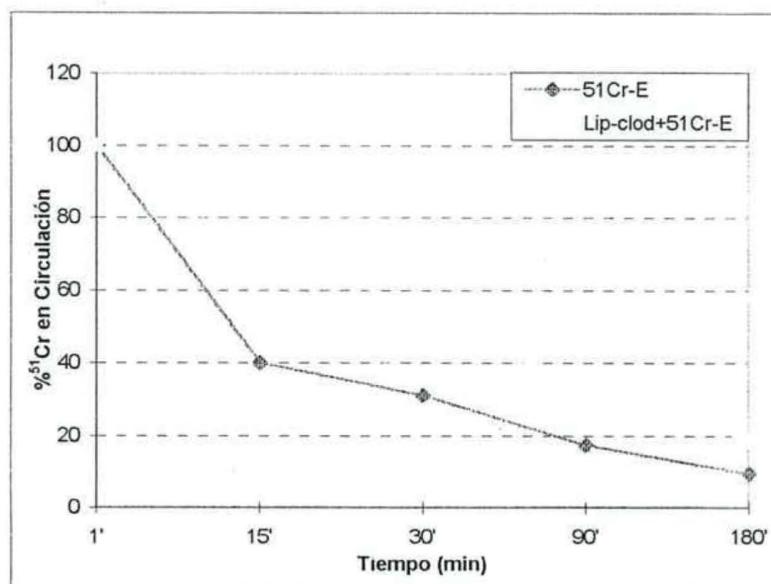


FIGURA 10a: Velocidad de *clearance* en animales deplecionados de macrófagos con Lip-clod e inoculados con ^{51}Cr -E.

Animales tratados con Lip-clod e inoculados con 1.4×10^{10} bacterias/200 μl de ^{51}Cr -E y normales tratados solo con ^{51}Cr -E, fueron sangrados al minuto y a los 15, 30, 90, 180 minutos p.i.

Se evaluó el porcentaje de ^{51}Cr circulante en un contador gamma.

Cada punto representa la media del % de radioactividad presente \pm ES de 3 animales.

•• p< 0.005 comparando Lip-clod + E con E, según el test de Student.

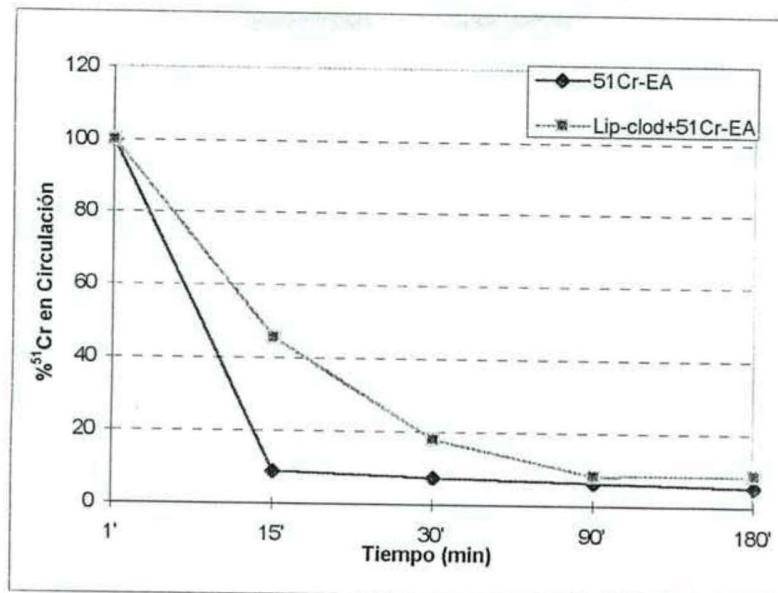


FIGURA 10b: Velocidad de *clearance* en animales deplecionados de macrófagos con Lip-clod e inoculados con ^{51}Cr -EA.

Animales tratados con Lip-clod e inoculados con 1.4×10^{10} bacterias/200 μl de ^{51}Cr -EA y normales tratados solo con ^{51}Cr -EA, fueron sangrados al minuto y a los 15, 30, 90, 180 minutos p.i.

Se evaluó el porcentaje de ^{51}Cr circulante en un contador gamma.

Cada punto representa la media del % de radioactividad presente \pm ES de 3 animales.

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

La *Figura 11a* nos permite observar que tanto en el hígado como en el bazo de los animales tratados con lip-clod, y posteriormente inoculados con bacteria hay una clara y significativa disminución de la captación de ^{51}Cr -E, tal como la técnica lo predice (29). Asimismo, el porcentaje de ^{51}Cr encontrado en sangre fue mayor en el grupo tratado con lip-clod y ^{51}Cr -E, comparado con el control, a consecuencia de la menor captación en bazo e hígado. Los riñones, y el fémur, no presentan diferencias significativas. Sin embargo, la captación por el pulmón resultó ser el doble, que cuando los animales solo fueron tratados con bacteria (grupo control), donde como ya habíamos visto anteriormente, la captación por este órgano, no era de relevancia frente a este antígeno.

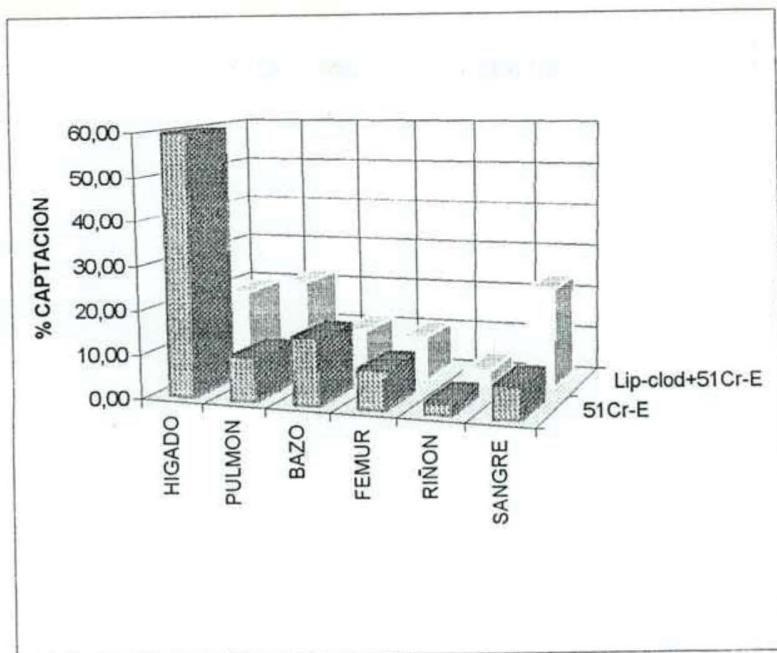


FIGURA 11a: Distribución de la marca en órganos a las 3 hs. p.i., en animales deplecionados de macrófagos con Lip-clod e inoculados con ^{51}Cr -E.

Animales tratados con Lip-clod e inoculados con 1.4×10^{10} bacterias/200 μl de ^{51}Cr -E y controles sin Lip-clod fueron sangrados y sacrificados y se les extrajo los distintos órganos a las 3 hs post inoculación.

Cada barra representa la media del % de radioactividad presente en cada órgano \pm ES de 3 animales.

•• $p < 0.005$ comparando Lip-clod +E con E, ••• $p < 0.0003$ comparando Lip-clod +E con E, según el test de Student.

El efecto del tratamiento con lip-clod y ^{51}Cr -EA, induce, el mismo tipo de distribución que el observado cuando los animales son tratados con lip-clod y ^{51}Cr -E. La marca en el hígado y en el bazo, disminuyen significativamente. El pulmón captó más del doble del porcentaje de marca observado en los animales controles (solo con ^{51}Cr -EA), llegando a atrapar casi un 50% de la marca total remanente presente. Sin embargo, la velocidad de *clearance* no se ve significativamente alterada y los riñones y el fémur, tampoco muestran diferencias significativas por los tratamientos realizados, *Figura 11b*.

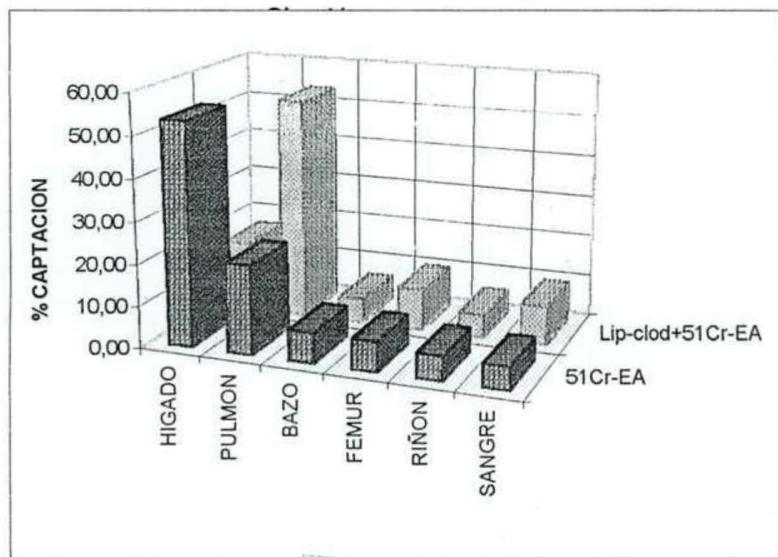


FIGURA 11b: Distribución de la marca en órganos a las 3 hs. p.i., en animales deplecionados de macrófagos con Lip-clod e inoculados con ^{51}Cr -EA.

Animales tratados con Lip-clod e inoculados con 1.4×10^{10} bacterias/200 μl de ^{51}Cr -EA y controles sin Lip-clod fueron sangrados y sacrificados y se les extrajo los distintos órganos a las 3 hs post inoculación. Cada barra representa la media del % de radioactividad presente en cada órgano \pm ES de 3 animales.

** $p < 0.0008$ comparando EA con Lip-clod +EA.

*** $p < 0.0025$ comparando EA con Lip-clod +EA, según el test de Student

Es importante destacar el papel del pulmón como principal órgano efector del *clearance* de estos complejos inmunes y su fundamental participación frente a la eliminación de los macrófagos hepáticos y esplénicos.

4.- Estudios de toxicidad y sobrevida:

Para evaluar el impacto biológico de las diferencias observadas en cuanto a la velocidad de *clearance* y la distribución en los órganos del SMF entre E y EA se decidió hacer un ensayo de toxicidad. Para este propósito, se inocularon los ratones por vía endovenosa por inyección en el plexo retro-orbital, con distintas cantidades de E y EA. El complejo EA fue preparado en todos los casos a concentraciones subaglutinantes de anticuerpo, incubándolo 30 min. a 37°C con volúmenes iguales de bacteria. Solo se modificó la masa de bacteria

(manteniéndose siempre la misma relación bacteria-anticuerpo) hasta llegar a alcanzar concentraciones letales de esta.

En la *Figura 12a* podemos observar la cinética de sobrevida presentada a distintas dosis de bacteria inoculada. A dosis altas (2.7×10^{10} bacterias/200μl), las primeras muertes fueron registradas partir de 24 hs. p.i. Este es el tiempo que debe transcurrir para inducir la muerte en modelos murinos de shock séptico por tratamiento con LPS (*Figura 12a*).

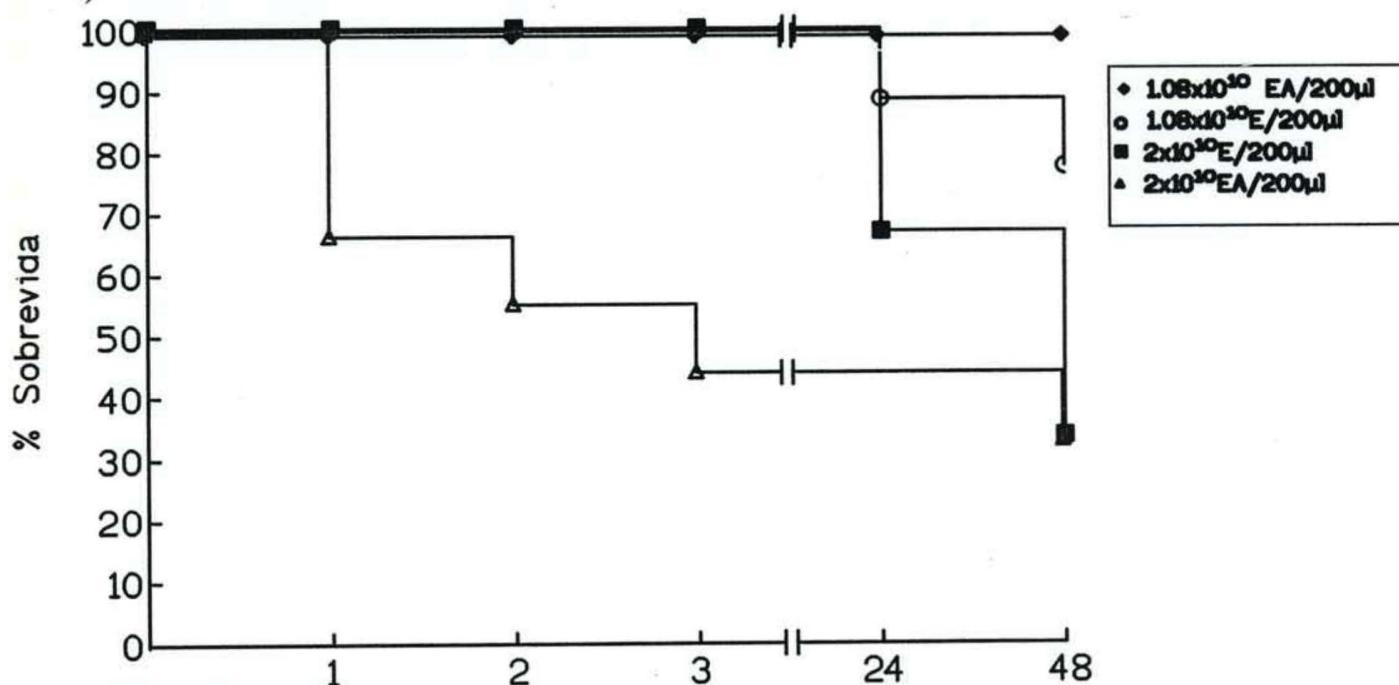


FIGURA 12a: Estudios de toxicidad en animales inoculados con distinto número de bacteria. Los animales fueron inoculados con distintas masas de E (1.08×10^{10} bacterias/200μl, 1.8×10^{10} bacterias/200μl y 2.7×10^{10} bacterias/200μl), y se graficaron los porcentajes de sobrevida en función del tiempo a las distintas dosis inoculadas. Se graficó un experimento representativo de tres.

Cuando la bacteria fue sensibilizada con anticuerpos específicos, se observó que a bajas concentraciones (1.08×10^{10} bacterias/200μl), el efecto tóxico fue menor que con bacteria sola, ya que los animales no mueren aún superadas las 48 hs p.i. No obstante, a medida que la concentración de EA aumenta, aumentan también los índices de mortalidad respecto al tiempo. A dosis altas de EA (entre 1.8×10^{10} bacterias/200μl y 2.7×10^{10} bacterias/200μl), los animales presentan una mortalidad entre el 70%-100% dependiendo de la

masa de EA utilizada. Sin embargo como puede observarse en la *Figura 12 b*, las muertes ocurren antes de las 3 primeras horas p.i.

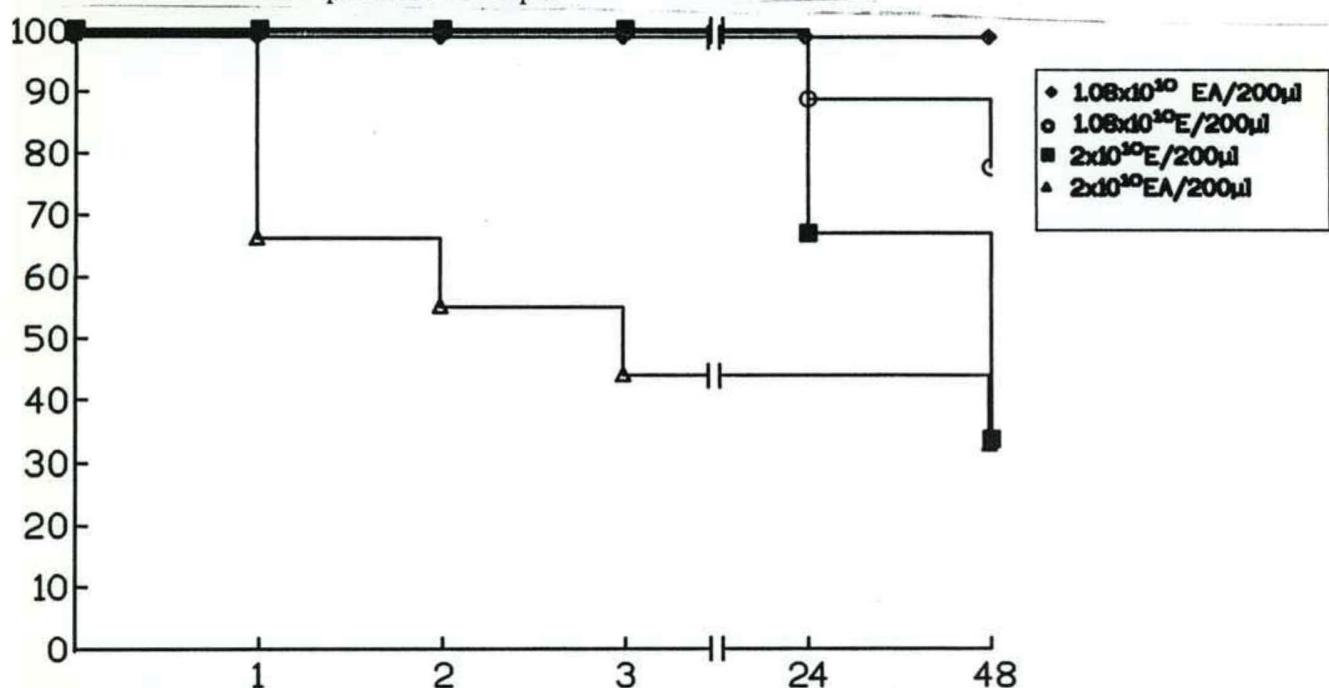


FIGURA 12b: Estudios de toxicidad en animales inoculados con distintas concentraciones de bacteria anticuerpo.

Los animales fueron inoculados con distintas masas de EA (1.08×10^{10} bacterias/200μl, 1.8×10^{10} bacterias/200μl y 2.7×10^{10} bacterias/200μl), y se graficaron los porcentajes de sobrevida en función del tiempo a las distintas dosis inoculadas. Se graficó un experimento representativo de tres.

Los macrófagos esplénicos y hepáticos constituyen una fuente importante de producción de citoquinas durante los estados de infección bacteriana y muchas de las mismas si son secretadas en grandes cantidades pueden tener efectos perjudiciales para el huésped. En este contexto, se decidió realizar un estudio de sobrevida con E o EA en animales pretratados con lip-clod. Para ello, se trataron a los ratones con 200μl de lip-clod 48 hs. antes de ser inoculados con una concentración letal de bacteria o bacteria-anticuerpo (2×10^{10} bacterias/200μl).

La *Figura 12 c* nos muestra que la ausencia de macrófagos hepáticos y esplénicos no modifica los índices de mortalidad observados por tratamiento con bacteria sola.

El tratamiento con EA., provoca una mortalidad superior al 50% antes de las 3 hs p.i Pasadas las 24 hs sólo sobreviven un 33% de los animales en estudio, manteniéndose así

hasta las 48 hs. Superado este tiempo, solo viven un 22% del grupo tratado. Sin embargo el tratamiento previo con CL₂MDP del grupo inoculado con EA, induciría un efecto protector, ya que aún superadas las 72 hs. p.i. los animales sobreviven en muy buen estado general.

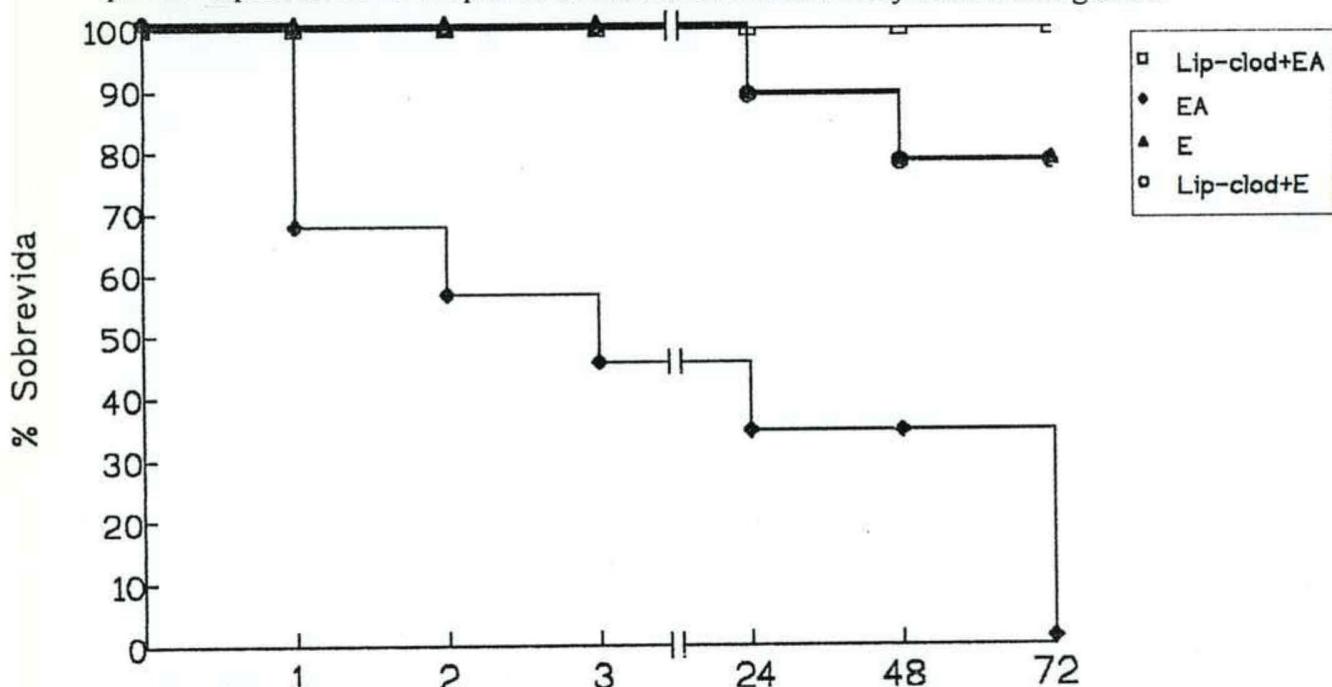


FIGURA 12 c: Estudios de sobrevida en animales inoculados con 2×10^{10} bacterias/200 μ l de bacteria o bacteria anticuerpo.

Los animales fueron inoculados con 2×10^{10} bacterias/200 μ l de bacteria o bacteria-anticuerpo y se graficaron los porcentajes de sobrevida en función del tiempo.

Se graficó un experimento representativo de tres, n=4.

Asimismo, analizamos si la activación del complemento participaba en los fenómenos de muerte temprana observada al inocular altas dosis de EA. Los resultados mostraron que la eliminación del complemento no influiría en la sobrevida de los animales tratados con el complejo bacteria-anticuerpo. No se observó protección en el porcentaje de mortalidad ni una mejora en la evolución de la patología que sufren los animales luego de la inoculación de EA, en referencia a la diarrea, hipotensión, observados durante el período de estudio (resultados no mostrados).

5.- Correlación de producción de TNF- α *in vivo*:

Considerando los resultados obtenidos durante los estudios de sobrevida y *clearance* en animales deplecionados de macrófagos, nos preguntamos si este fenómeno estaba asociado a una mayor y más sostenida secreción de TNF- α por parte de los MØ cuando se inoculaba EA. Con este fin, se inocularon ratones con la misma concentración de E o EA, utilizada en los experimentos de *clearance*. A los 90 min. y a las 3 hs. p.i. se tomaron 200 μ l de sangre por punción del plexo retro-orbital del que se obtuvieron los sueros, como se detalló en Materiales y Métodos. Se determinó la concentración de TNF- α presente en los sueros mediante la técnica de sensibilidad a TNF- α de la línea celular fibroblástica murina L-929.

En los animales inoculados con bacteria o bacteria sensibilizada con anticuerpos, no existen diferencias significativas sobre la liberación de TNF- α , en ambos casos la producción es máxima a los 90 min. p.i, y a las 3 horas p.i. los niveles de TNF- α son muy bajos, aún en el grupo inoculado con EA. E: (85 \pm 21) U/ml; EA: (64 \pm 0) U/ml.

Estos resultados estarían indicando que la muerte a tiempos cortos observados en los animales tratados con EA no estaría asociada a una mayor o más sostenida liberación sistémica de TNF- α en el tiempo.

6.- Papel de los polimorfonucleares (PMN) en el *clearance* de *Escherichia coli* O111:B4 sensibilizada con anticuerpos específicos:

6.1.- Fagocitosis *in vivo* de *E. coli* fluoresceinada:

Con el fin de evaluar el tipo celular involucrado en la fagocitosis de E o EA, se fluoresceinó a la bacteria (E^F) y a la bacteria-anticuerpo (E^FA), manteniendo en la formación del complejo, la misma relación y concentración utilizada hasta el momento, tal como se detalló en Materiales y Métodos. Se determinó el porcentaje de fagocitosis, considerando que a través de la inoculación endovenosa de E^F o E^FA se puede determinar no solo el nivel de fagocitosis *in vivo* sino que también es posible inferir la población celular fagocítica.

Los ratones inoculados por vía endovenosa, fueron sangrados a los 5 min. y a las 3 hs. p.i. En este último tiempo, los animales fueron sacrificados y se extrajeron el hígado, el bazo y los pulmones. Los mismos fueron procesados como se explicó en Materiales y Métodos y se analizó la suspensión celular obtenida, por citometría de flujo. El número de células fluoresceinadas indica el grado de adherencia y/o fagocitosis que ha ocurrido *in vivo*, ya que la bacteria libre por forma y tamaño no es leída dentro de los parámetros utilizados para adquirir la suspensión celular. La intensidad media de fluorescencia sugeriría el número de bacterias por célula fagocítica.

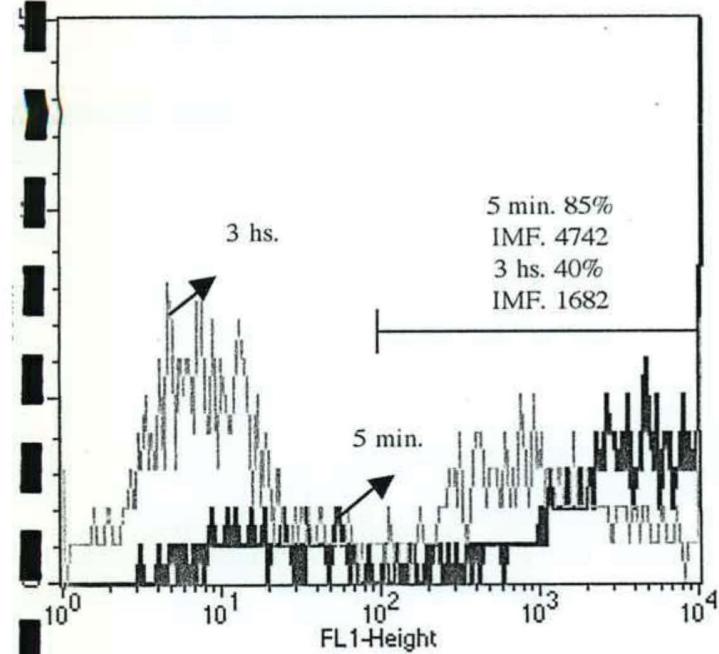
La **Figura 13**, nos muestra que la sangre obtenida a los 5 min. p.i. presenta un porcentaje significativamente mayor de PMN fagocitando E^F que en el caso de $E^F A$, asimismo el número de bacterias fagocitadas es también significativamente mayor en ausencia de anticuerpos. Esta diferencia desaparece a las 3 hs.

Cuando se analizó la fagocitosis en los órganos a las 3 hs. p.i., se encontró que el bazo presentaba un porcentaje mayor de fagocitosis de bacteria que de bacteria-anticuerpo, aunque el número de bacterias fagocitadas por célula fue el mismo en ambos casos (**Figura 14**).

Los pulmones mostraron, en cambio, un comportamiento inverso. El porcentaje de PMN fagocitando $E^F A$ y el número de $E^F A$ fagocitados, fue significativamente mayor que en el caso del tratamiento por E^F sola (**Figura 15**).

Por último la **Figura 16** nos muestra que los hígados de los animales tratado con E^F o $E^F A$, presentan el mismo porcentaje de PMN fagocitando el mismo número de bacterias por células.

Bacteria



Bacteria-anticuerpo

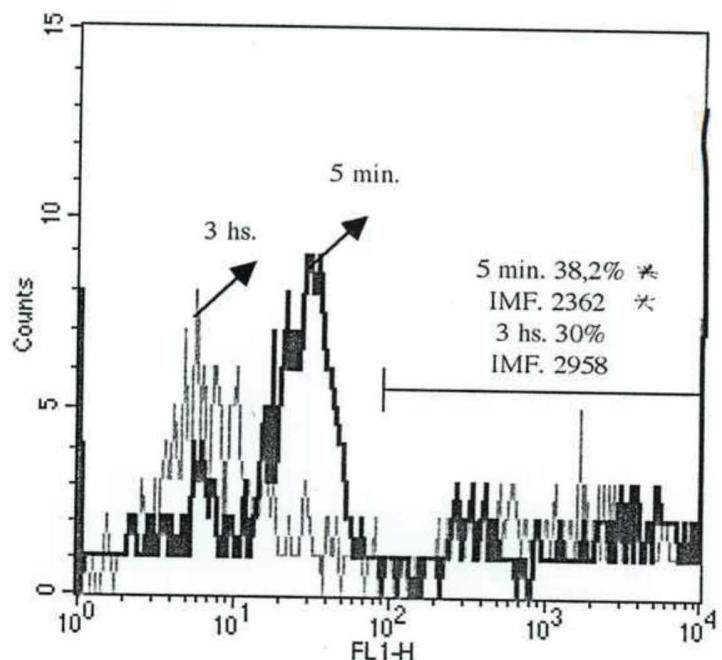


FIGURA 13: A los 5 min. y a las 3 hs. p.i. de 1.4×10^{10} bacterias/200 μl de E o EA fluoresceína se obtuvieron de cada grupo 200 μl de sangre. Se evaluó el % de fagocitosis por PMN y la intensidad media de fluorescencia (IMF) por citometría de flujo.

A los 5 min. p.i. se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

Se muestra un animal representativo de 3.

* $p < 0,045$, comparando con E^F , según el test de Student

En el gráfico de puntos se muestran los parámetros de FSC (tamaño) y SSC (complejidad de las células) y se muestra la región evaluada, considerada como la perteneciente a los PMN.

En la figura b la ordenada y la abscisa representan el número de células y la intensidad media de fluorescencia, respectivamente.

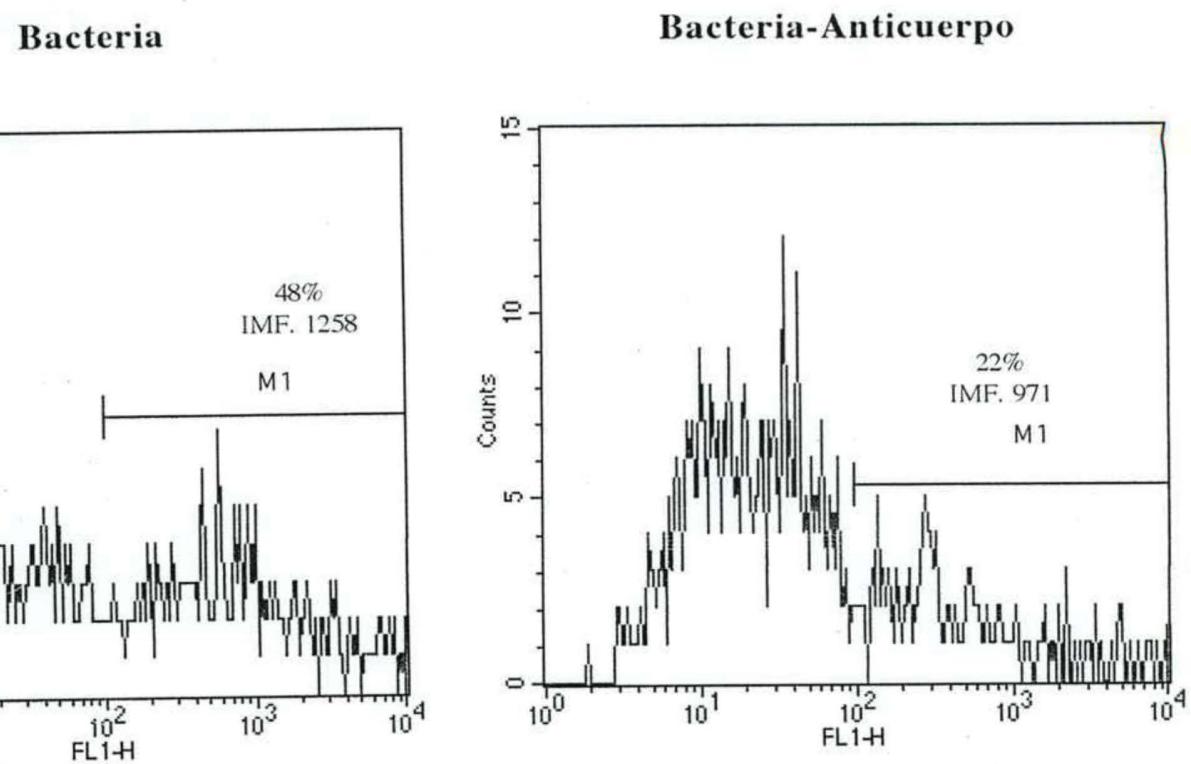


FIGURA 14: A las 3 hs. p.i. de 1.4×10^{10} bacterias/200 μ l de E o EA fluoresceína, los animales fueron sacrificados y se les extrajo el bazo. Se evaluó el % de fagocitosis por PMN y la intensidad media de fluorescencia (IMF) por citometría de flujo. Se muestra un animal representativo de 3.

Se muestra un animal representativo de 3.

En el gráfico de puntos se muestran los parámetros de FSC (tamaño) y SSC (complejidad de las células) y se muestra la región evaluada, considerada como la perteneciente a los PMN.

En la figura b la ordenada y la abscisa representan el número de células y la intensidad media de fluorescencia, respectivamente.

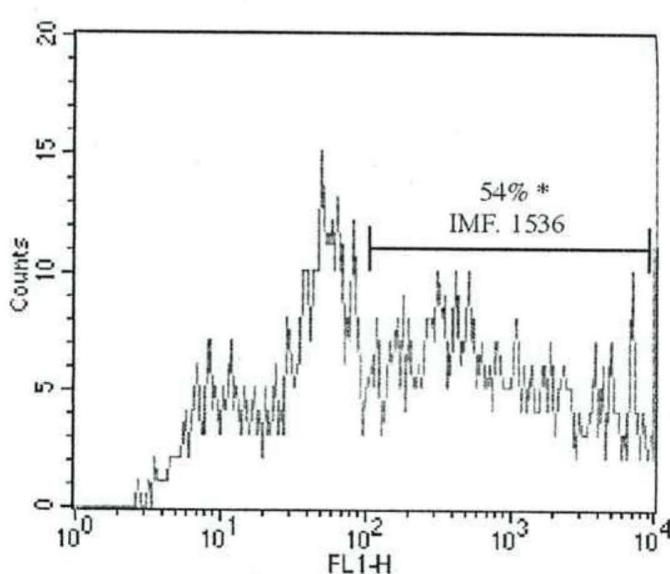
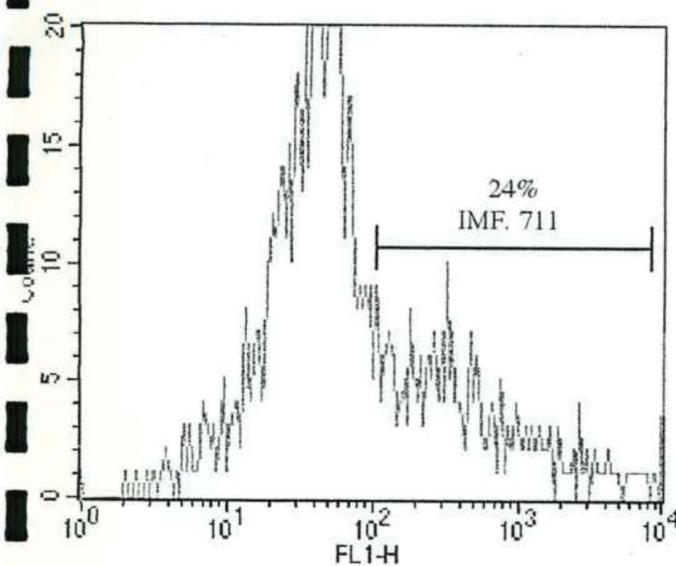


FIGURA 15: A las 3 hs. p.i. de 1.4×10^{10} bacterias/200 μ l de E o EA fluoresceína, los animales fueron sacrificados y se les extrajeron los pulmones. Se evaluó el % de fagocitosis por PMN y la intensidad media de fluorescencia (IMF) por citometría de flujo.

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

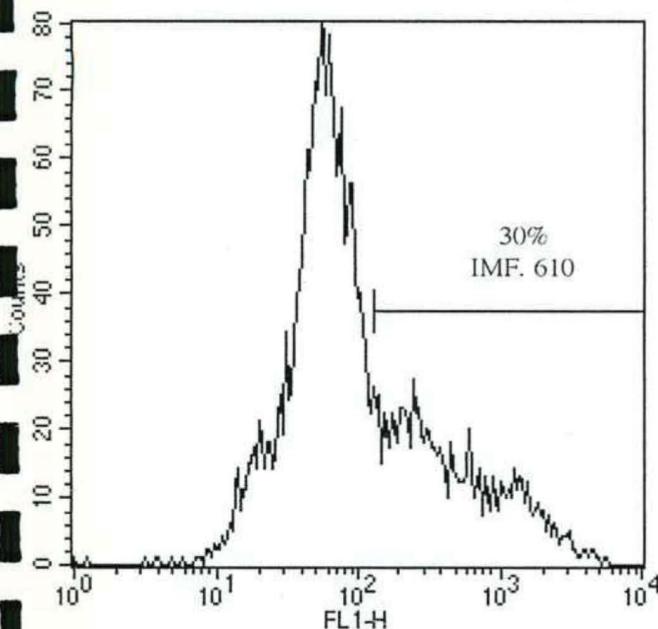
Se muestra un animal representativo de 3.

* $p < 0.0012$, comparando con E^F , según el test de Student

En el gráfico de puntos se muestran los parámetros de FSC (tamaño) y SSC (complejidad de las células) y se muestra la región evaluada, considerada como la perteneciente a los PMN.

En la figura b la ordenada y la abscisa representan el número de células y la intensidad media de fluorescencia, respectivamente.

Bacteria



Bacteria-Anticuerpo

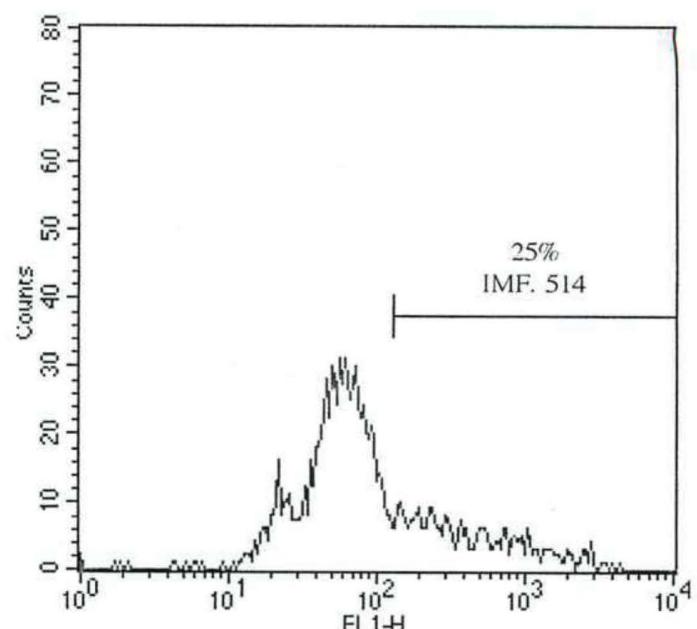


FIGURA 16: A las 3 hs. p.i. de 1.4×10^{10} bacterias/200 μ l de E o EA fluoresceína, los animales fueron sacrificados y se les extrajo el hígado. Se evaluó el % de fagocitosis por PMN y la intensidad media de fluorescencia (IMF) por citometría de flujo.

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

Se muestra un animal representativo de 3.

En el gráfico de puntos se muestran los parámetros de FSC (tamaño) y SSC (complejidad de las células) y se muestra la región evaluada, considerada como la perteneciente a los PMN.

En la figura b la ordenada y la abscisa representan el número de células y la intensidad media de fluorescencia, respectivamente.

La **Tabla 1** nos muestra los resultados obtenidos en la evaluación del porcentaje de fagocitosis efectuada por los PMN, y el número de bacterias o bacteria-anticuerpos fluoresceinados fagocitados por células representado como la intensidad media de fluorescencia (IMF).

% FAGOCITOSIS e INTENSIDAD MEDIA DE FLUORESCENCIA (IMF)						
	SANGRE		PULMON		BAZO	
Tratamiento	E ^F	E ^F A	E ^F	E ^F A	E ^F	E ^F A
Tiempo	% / IMF (X±ES)	% / IMF (X±ES)	% / IMF (X±ES)	% / IMF (X±ES)	% / IMF (X±ES)	% / IMF (X±ES)
5 min.	85±0.2 3643±1099	47±8* 2649±286	ND	ND	ND	ND
3 hs	40±9 1448±119	36±5 2023±935	34±0.7 922±401	61.36±1** 1629±104	44±11 908±383	23±0.7 745±367

Tabla 1: Porcentaje de fagocitosis de bacteria fluoresceinada por los PMN *in vivo*:

A los 5 min. a las 3hs. p.i. de 1.4×10^{10} bacterias/200 μ l de E^F o E^FA fluoresceinada se obtuvieron de cada grupo 200 μ l de sangre obtenida por punción del plexo retro-orbital. A las 3 hs se les extrajo el bazo y el pulmón. Se evaluó el % de fagocitosis y la intensidad media de fluorescencia (IMF) por citometría de flujo.

Se consideró un experimento representativo de 3., ND: no determinado., * p<0,045 comparado con E^F

** p<0,0012 comparado con E^F, según el test de Student

6.2.- Efectividad de los PMN para fagocitar EA en sangre entera, *in vitro*.

Los resultados mostrados en la *Tabla 1*, sugieren que los PMN *in vivo*, poseen una capacidad fagocítica mayor en sangre periférica, al ser estimulados con bacteria, que con la bacteria sensibilizada con anticuerpos específicos, a tiempos cortos. Con el fin de determinar si esto se debía a una característica propia del sistema se realizó un ensayo de fagocitosis *in vitro* incubando alicuotas de 200 μ l de sangre entera de ratones normales con 2.7×10^{09} bacterias/15 μ l bacteria fluoresceinada sola o pre-sensibilizada con anticuerpos (E^F, E^FA). Luego de 15 min. de agitación a 37°C, las células fueron centrifugadas, lavadas y la suspensión celular fue analizada por citometría de flujo. Al mismo tiempo se separaron fracciones de estas suspensiones, que fueron aisladas para realizar un tratamiento ácido con glicina y clorhídrico, tal como se detalló en Materiales y Métodos, con el propósito de despegar las células que estuvieran adheridas a la superficie de las células fagocíticas y que no hubiesen sido fagocitadas por las mismas.

Así podemos ver en la *Tabla 2*, que los PMN mostraron *in vitro* una mayor capacidad fagocítica ante la presencia de la bacteria sensibilizada con anticuerpos que ante la bacteria sin sensibilizar, y que el tratamiento ácido, demostró que las bacterias habían sido fagocitadas en más de un 90%.

FAGOCITOSIS por PMN en SANGRE ENTERA % / IMF: (X±ES)				
Tiempo	E^F	E^F+T.A	E^FA	E^FA+T.A
15 min.	66.5 ± 3.5 6602 ± 100	61 ± 3.5 5425 ± 425	95 ± 4* 8620 ± 120**	94 ± 4* 8250 ± 249*

Tabla 2: Efectividad de los PMN para fagocitar bacteria en sangre entera:

A partir de sangre entera de un animal normal se tomaron 200 μ l de la misma y se incubaron a 37°C durante 15 min. en agitación con 2.7×10^{09} bacterias/15 μ l de E^F o E^FA. A otro grupo de muestras se les hizo además un tratamiento ácido (TA) posterior a la incubación con bacteria o bacteria-anticuerpo fluoresceinada. Los resultados se evaluaron por citometría de flujo.

Se consideró un experimento representativo de 3.

Se encontraron diferencias significativas en todos los tratamientos.

* $p < 0,003$ comparando con E^F con o sin tratamiento ácido.

** $p < 0,006$ comparando con E^F, según el test de Student

Los resultados obtenidos en sangre periférica nos permiten concluir que aunque el porcentaje de PMN fagocitando E es mayor que EA *in vivo*, esto no se debe a una menor capacidad fagocítica *per se*, ya que *in vitro* no solo es significativamente mayor el porcentaje de neutrófilos fagocitando bacteria-anticuerpo sino que es también mayor la cantidad de bacteria por célula.

7.- Cuantificación de los PMN en sangre y pulmón:

Dado que los estudios de citometría de flujo revelaron que la fagocitosis de E o EA era efectuada principalmente por los PMN, y que el porcentaje de fagocitosis en los pulmones y en sangre periférica mostraron diferencias significativas entre grupos, se decidió

evaluar el porcentaje de PMN en ambos sitios, de manera de establecer si existía alguna correlación entre el número de PMN y el aumento de la captación de EA por el pulmón.

Los resultados mostrados en la *Tabla 3* demuestran que el pulmón del grupo tratado con EA presenta un número significativamente mayor de PMN que el tratado con E. Al mismo tiempo, este aumento se correlaciona, con una disminución en el número de PMN circulantes. Cuando el tratamiento fue efectuado con bacteria, el porcentaje de PMN en sangre periférica, disminuye respecto al control, pero en pulmón el número de PMN no se modificó.

% PMN <i>in vivo</i>						
	% en SANGRE (X±ES)			% en PULMON (X±ES)		
Tiempo	Control	E	EA	Control	E	EA
5 min.	22±1	18±11	13±4*	ND	ND	ND
3 hs.	43±4	15±5♣	19±1♣	24±1	29.7±3	39±1**

Tabla 3: Porcentaje de PMN presentes en sangre y en pulmón:

A los 5 min. post inyección de E o EA se extrajeron de cada grupo 200 μ l de sangre obtenida del plexo retro-orbital y a las 3 hs se extrajo el pulmón luego de sangrar a los animales. Se evaluó el % de PMN según forma y tamaño por citometría de flujo en todas las muestras obtenidas.

Se consideró un experimento representativo de 3.

ND: no determinado.

* $p < 0,045$, comparado con el Control.

** $p < 0,0087$, comparado con el Control

♣ $p < 0,02$ comparado con el Control, según el test de Student.

8.- Bloqueo de la migración de PMN por anti-CD11b/CD18 (anti Mac-1):

Los PMN pueden ser reclutados desde la circulación por la presencia de un microorganismo, a través de una cascada de eventos de adhesión entre los leucocitos y el endotelio vascular, dirigido por citoquinas quimiotractantes e inflamatorias producidas por el huésped en respuesta al estímulo inflamatorio. Estos PMN circulantes inician contacto y hacen “rolling” a lo largo del endotelio activado, utilizando moléculas de adhesión de la familia de las selectinas (L-, P- y E-selectinas). Así en las proximidades de la superficie del endotelio, los PMN son activados por factores del complemento, citoquinas, productos bacterianos, y haptotaxinas como la IL-8 y el factor activador de plaquetas (PAF), entre otros, que resulta en la firme adherencia de los PMN al endotelio. Este paso estaría mediado principalmente por la β_2 integrina, CD11b/CD18. Dado que se sabe que la endotoxina de *E.coli* es capaz de inducir la emigración de los PMN tanto en la circulación sistémica como en la pulmonar (119), y con el fin de confirmar la participación de los neutrófilos en el *clearance* del complejo bacteria anticuerpo en este proceso, se decidió bloquear la migración de los mismos por utilización de anti CD11/CD18 (anti Mac-1). Para este fin se inoculó por vía endovenosa, el anticuerpo monoclonal, anti Mac-1, media hora antes de los experimentos de *clearance* (119). Estos estudios fueron llevados a cabo tal como se detalló anteriormente, inoculando la bacteria o el complejo inmune marcado con ^{51}Cr por vía endovenosa, y sangrando seriadamente hasta las 3 hs p.i, cuando los animales son sacrificados y sus órganos extraídos.

Así podemos observar en la *Figura 17a* que la velocidad de *clearance* en el grupo tratado con anti CD11b/CD18 (anti Mac-1) y luego inoculado con bacteria, fue significativamente menor durante las primeras 3 hs. de estudio, igualándose posteriormente con el grupo control. En el período comprendido entre las 24 y las 48 hs. la marca se mantuvo constante sin presentar diferencias significativas entre los grupos evaluados.

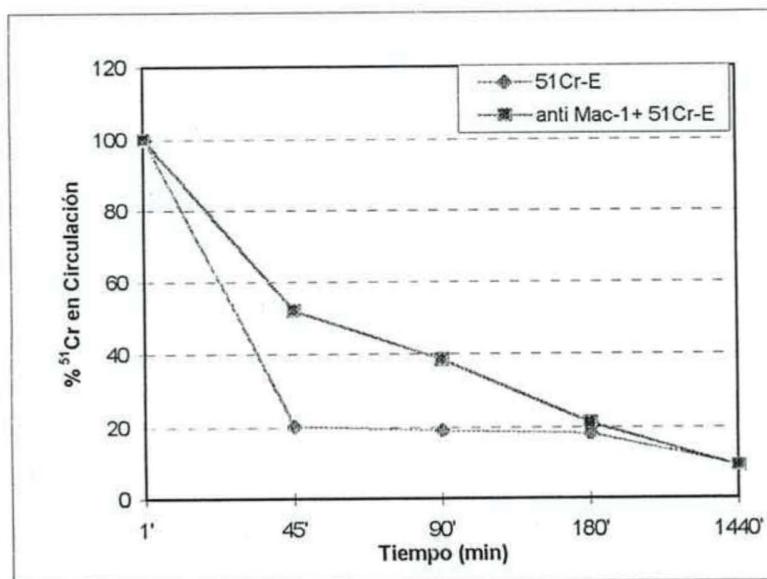


FIGURA 17a: Velocidad de *clearance* en animales tratados con anti Mac-1 e inoculados con ^{51}Cr -E. Ratones previamente tratados con anti Mac 1, e inoculados con 1.4×10^{10} bacterias/200 μl de ^{51}Cr -E y normales tratados solo con ^{51}Cr -E, fueron sangrados al minuto y a los 45, 90, 180, 1440 (24 hs.), 2880 (48 hs.), minutos p.i.

Se evaluó el porcentaje de ^{51}Cr circulante en un contador gamma.

Cada punto representa el % de radioactividad presente \pm ES de 3 animales.

A partir de los 45 min. y hasta las 3 hs. p.i. se encontraron diferencias significativas.

• $p < 0.05$ comparando E vs anti Mac-1 + E, según el test de Student

La velocidad de *clearance* en el grupo tratado con anti Mac-1 y bacteria-anticuerpo, no presentó modificaciones respecto al grupo control (sin anti Mac-1) en todo el rango de estudio *Figura 17b*.

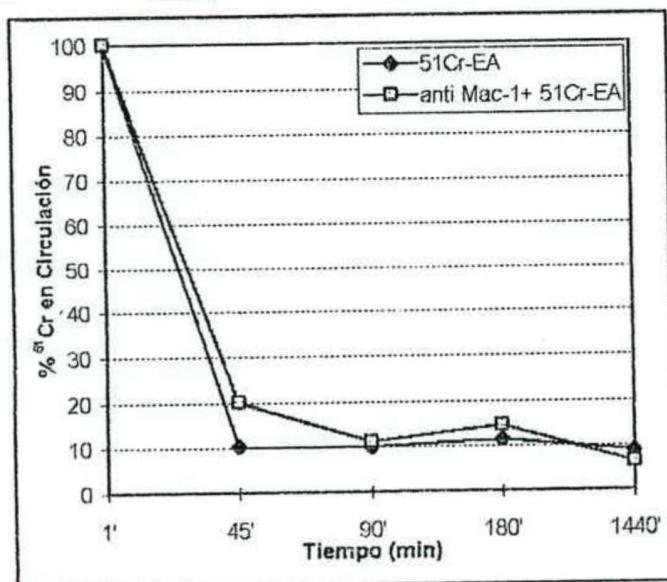


FIGURA 17b: Cinética de la velocidad de *clearance* en animales tratados con anti Mac-1 e inoculados con ^{51}Cr -EA.

Ratones previamente tratados con anti Mac 1, e inoculados con 1.4×10^{10} bacterias/200 μl de ^{51}Cr -EA y normales tratados solo con ^{51}Cr -EA, fueron sangrados al minuto y a los 45, 90, 180, 1440 (24 hs.), 2880 (48 hs.), minutos p.i.

Se evaluó el porcentaje de ^{51}Cr circulante en un contador gammá.

Cada punto representa la media de radioactividad presente \pm ES de 3 animales.

No se encontraron diferencias significativas en todo el periodo de estudio.

Al analizar la distribución de la marca en los órganos a las 3 hs. p.i. se encontró que el tratamiento con anti Mac-1, induce una disminución significativa de la captación de bacteria en el hígado aunque no modifica la marca en los pulmones. En el bazo en cambio, aumenta el porcentaje de captación. En el fémur y los riñones, no se observaron diferencias entre grupos, *Figura 18a*.

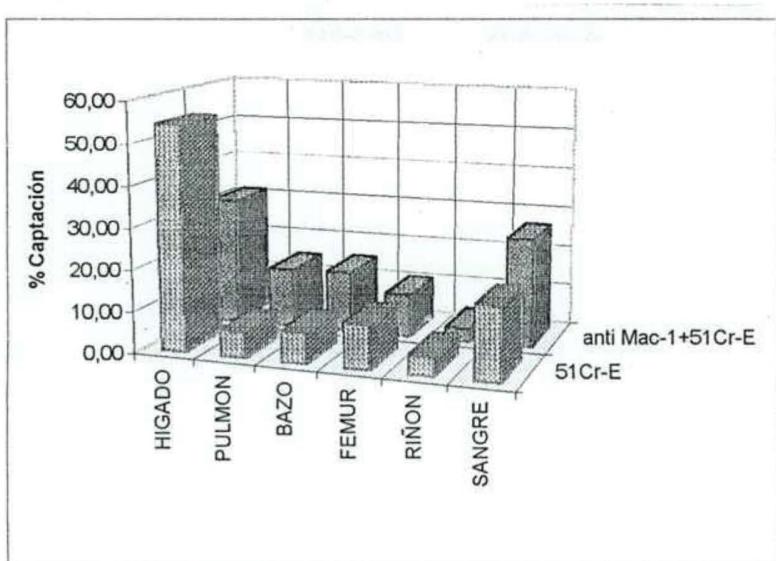


FIGURA 18a: Distribución de la marca en órganos a las 3 hs. p.i., en animales tratados con anti Mac-1 e inoculados con ^{51}Cr -E.

Animales tratados con anti Mac-1 e inoculados con 1.4×10^{10} bacterias/200 μl de ^{51}Cr -E y controles sin anti Mac-1 fueron sangrados y sacrificados y se les extrajo los distintos órganos a las 3 hs post inoculación.

Cada barra representa la media de radioactividad presente en cada órgano \pm ES de 3 animales.

• $p < 0.05$ comparando anti Mac-1 + E vs E, según el test de Student

En los animales inoculados con bacteria-anticuerpo, el tratamiento con anti Mac-1 produjo una disminución en el porcentaje de captación solo en pulmón. El hígado y el bazo compensaron tal disminución con un ligero aumento en la captación (aunque no significativa). En el resto de los órganos evaluados: riñones, fémur y la sangre la marca se distribuyó sin producir diferencias significativas por el tratamiento con anti Mac-1.

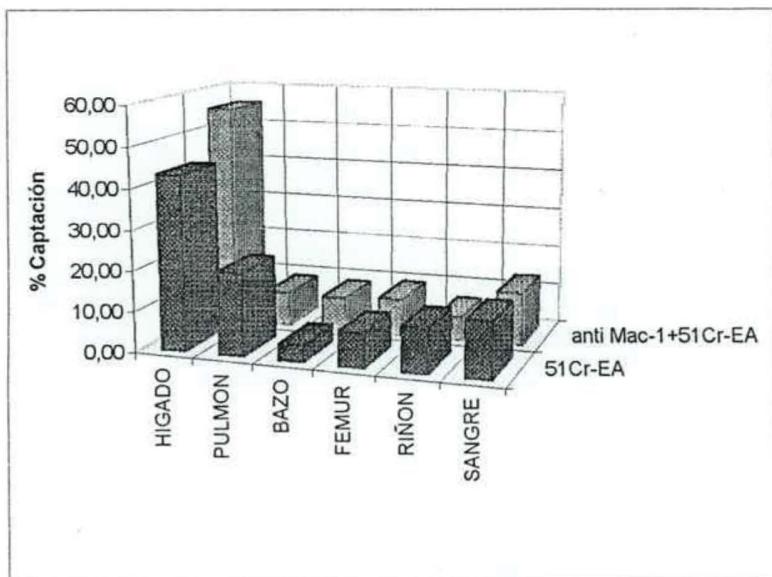


FIGURA 18b: Distribución de la marca en órganos a las 3 hs. p.i., en animales tratados con anti Mac-1 e inoculados con ^{51}Cr -EA.

Animales tratados con anti Mac-1 e inoculados con 1.4×10^{10} bacterias/200 μl de ^{51}Cr -EA y controles sin anti Mac-1 fueron sangrados y sacrificados y se les extrajo los distintos órganos a las 3 hs post inoculación.

Cada barra representa la media de radioactividad presente en cada órgano \pm ES de 3 animales.

* $p < 0.16$ comparando anti Mac-1 + EA vs EA, según el test de Student

9.- Estudios de histopatología:

Los estudios de distribución de la bacteria o bacteria-anticuerpo y su correlación con la sobrevida se completaron con estudios histopatológicos de los órganos mas involucrados, los pulmones y el hígado.

Los resultados obtenidos se resumen en la *Tabla 4*.

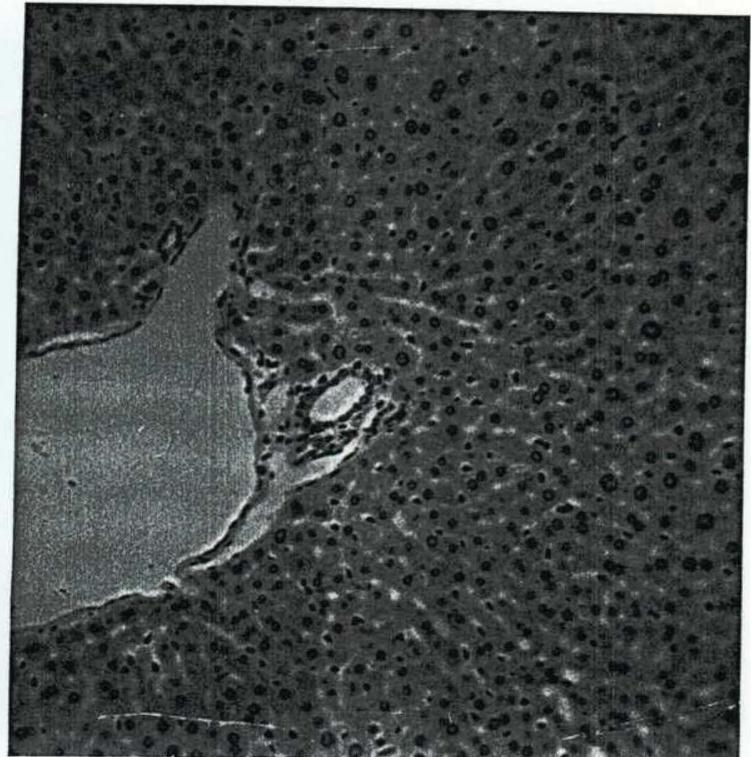
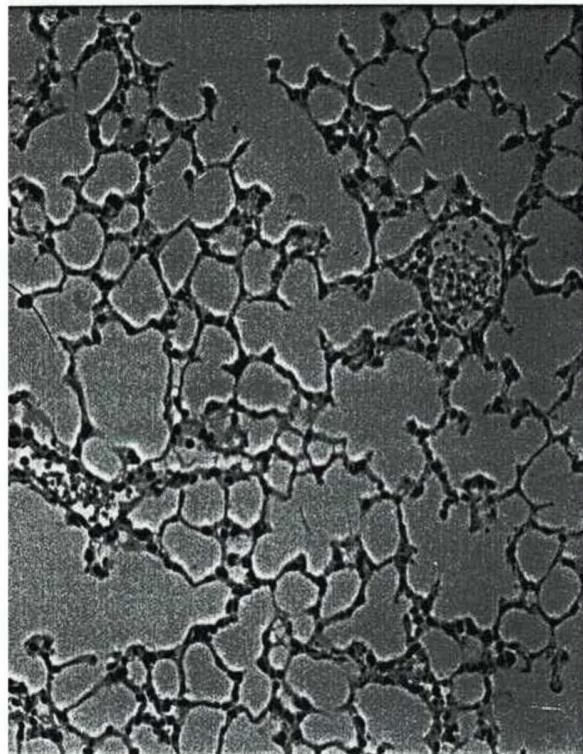
Tratamiento				
Descripción en Pulmón	E	E + Lip-clod	EA	EA + Lip-clod
Parénquima	Distendido (normal).	Semi distendido con engrosamiento de los septos.	Colapsado. Marcado engrosamiento de los septos y pérdida de la citoarquitectura	Semi distendido, con engrosamiento de los septos.
Congestión vascular	Ausente	Escasa congestión vascular y celular.	Marcada congestión vascular y celular en capilares septales y arteriolas bronquiales. Observación de fenómenos edematosos.	Congestión vascular y celular, presentes.
Nº de PMN	Escaso nº de PMN presentes en capilares (marginales) septales y en parénquima	Aumento de PMN marginales, septales y en parénquima	Abundante infiltración de PMN intraseptal y en parénquima. Ausencia de PMN marginales.	Dilatación vascular con abundante número de PMN intravasculares con tendencia a la marginación, e intraseptales.

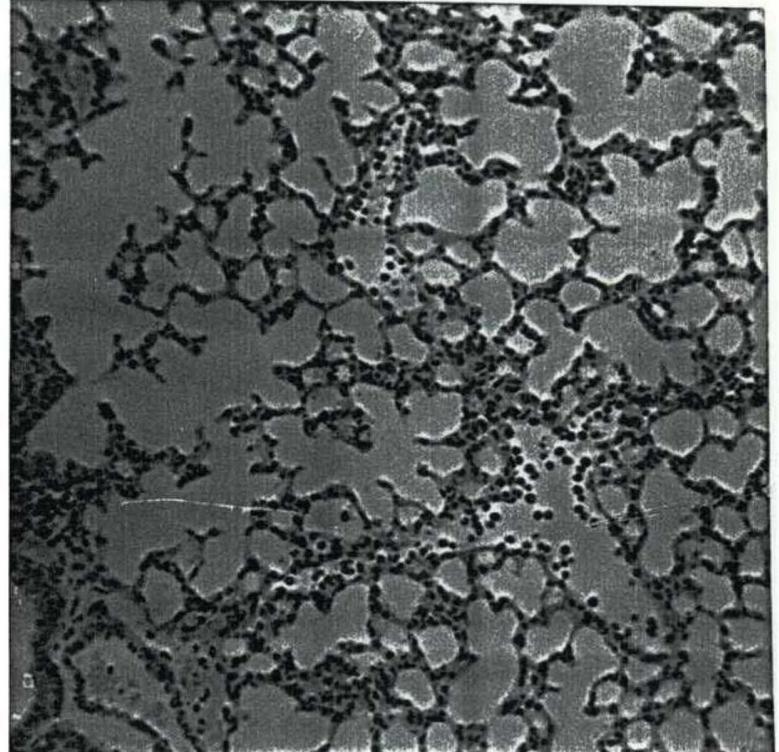
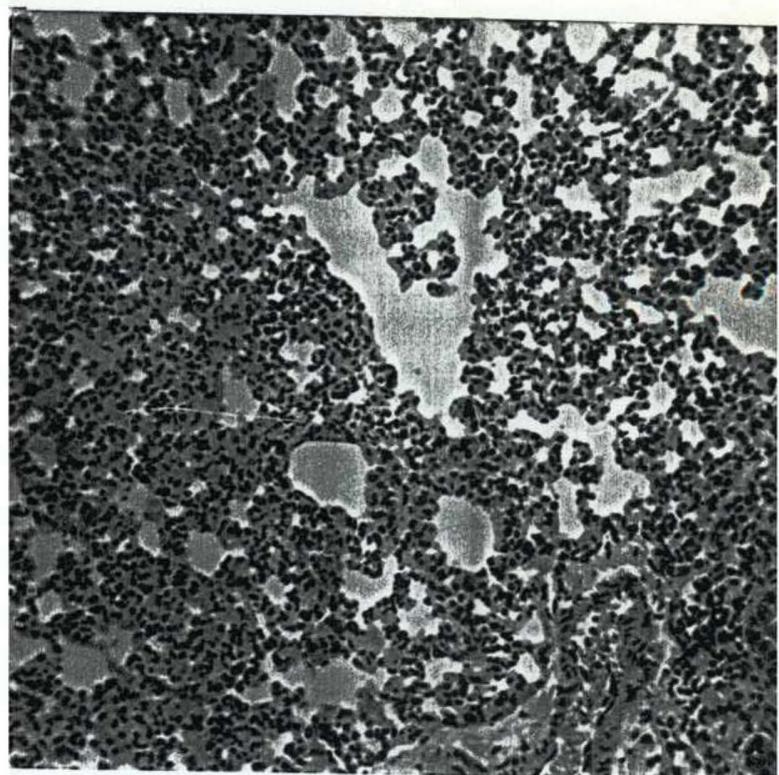
Descripción en Hígado	E	E + Lip-clod	EA	EA + Lip-clod
Parénquima	Disposición trabecular	Conservado, con disposición trabecular	Marcadamente alterado	Relativamente conservado. Moderado grado de destrabeculización
Espacio porta	Presente, con vena dilatada, y hematíes	Presente con vena centrolobulillar dilatada	No observado	Presente
Anisonucleosis y anisocitosis	Normal	Normal	No observado	Moderado
Degeneración hepatocitaria	Ausente	Ausente	Presente	No observado
Necrosis y fenómenos asociados	Ausente	Ausente	Presente. Pérdida de la citoarquitectura	Ausente

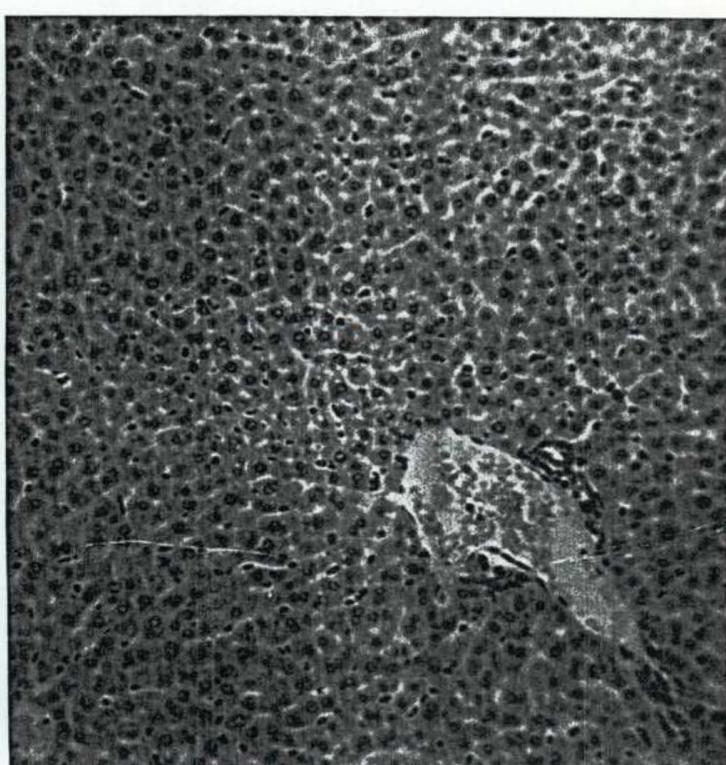
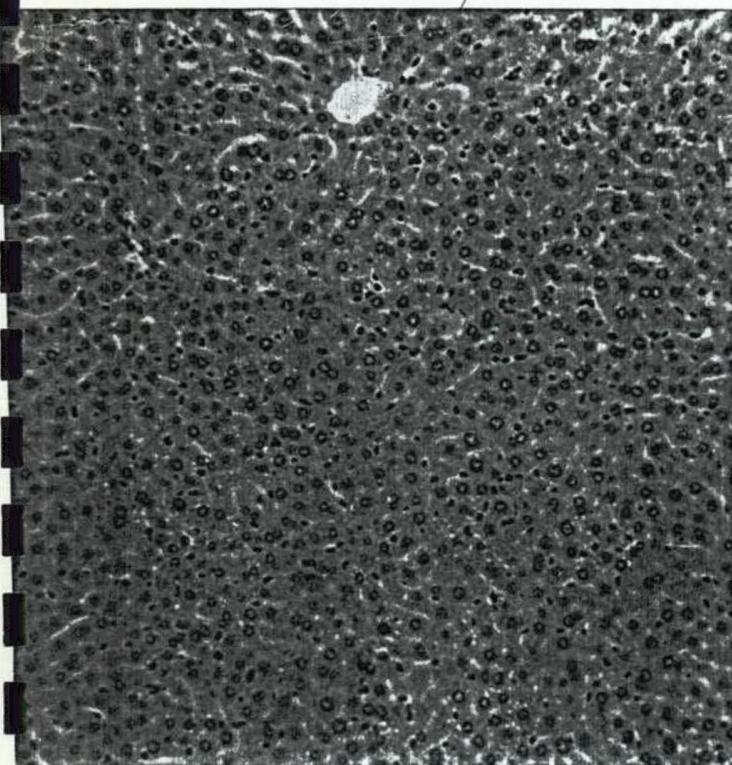
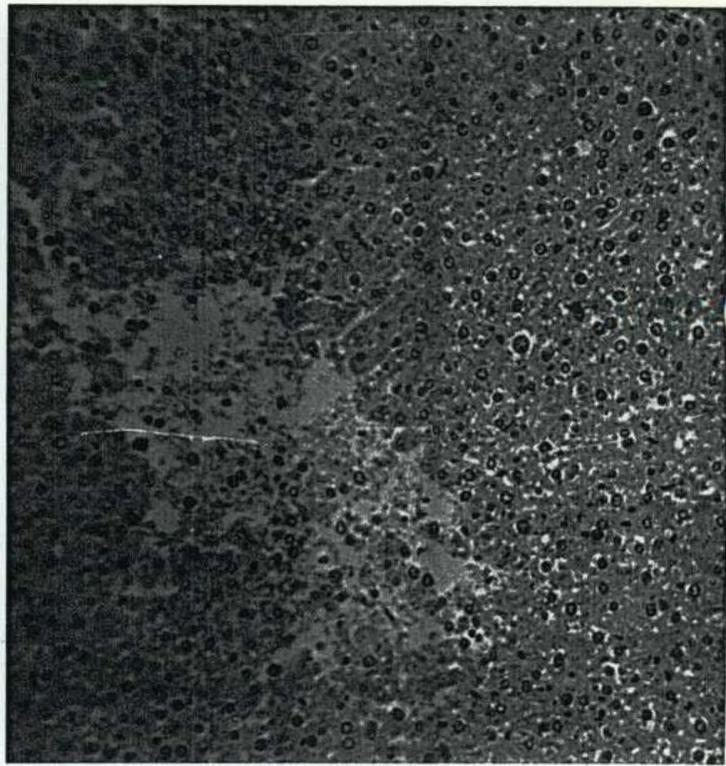
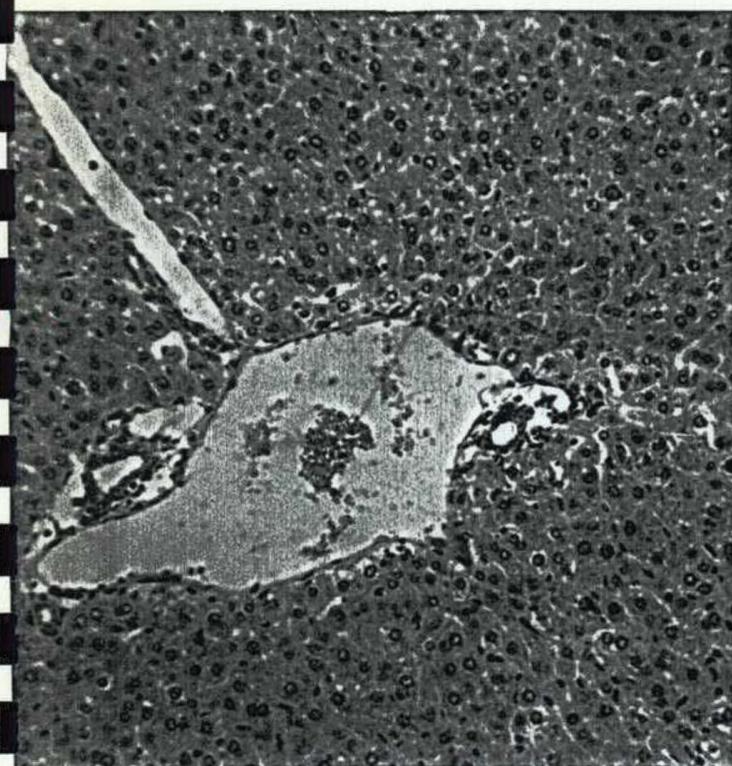
La *Figura 19b* nos muestra que frente a la inoculación de bacteria, los pulmones manifiestan pocas diferencias en cuanto a la presencia y la distribución de PMN siendo su estructura en general bastante bien conservada respecto del pulmón control (*Figura 19a*). En cambio cuando los animales fueron inoculados con bacteria-anticuerpo (*Figura 19c*), los pulmones de estos animales se vieron significativamente afectados, presentando todas las características detalladas en la **Tabla 4**. La depleción de macrófagos hepáticos y esplénicos,

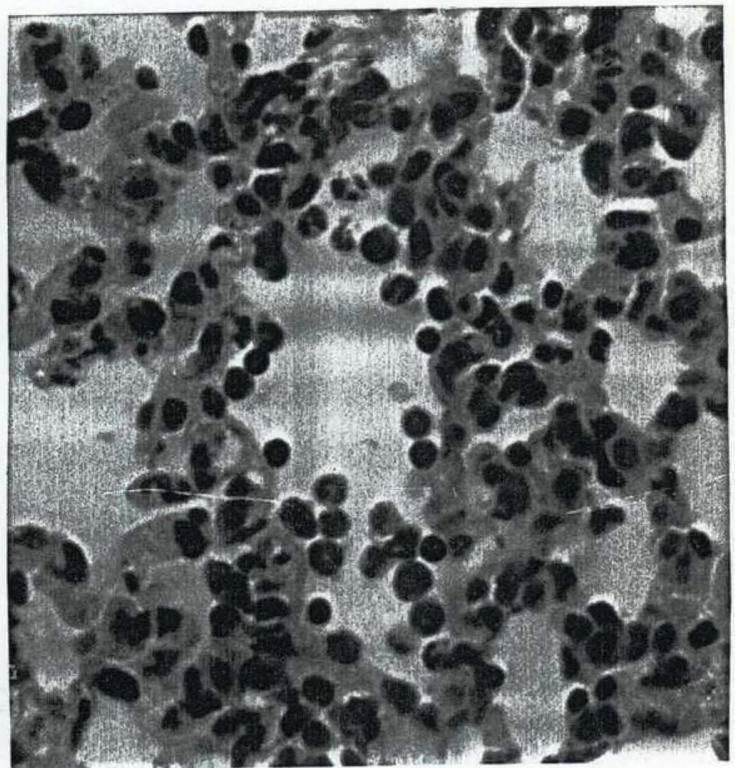
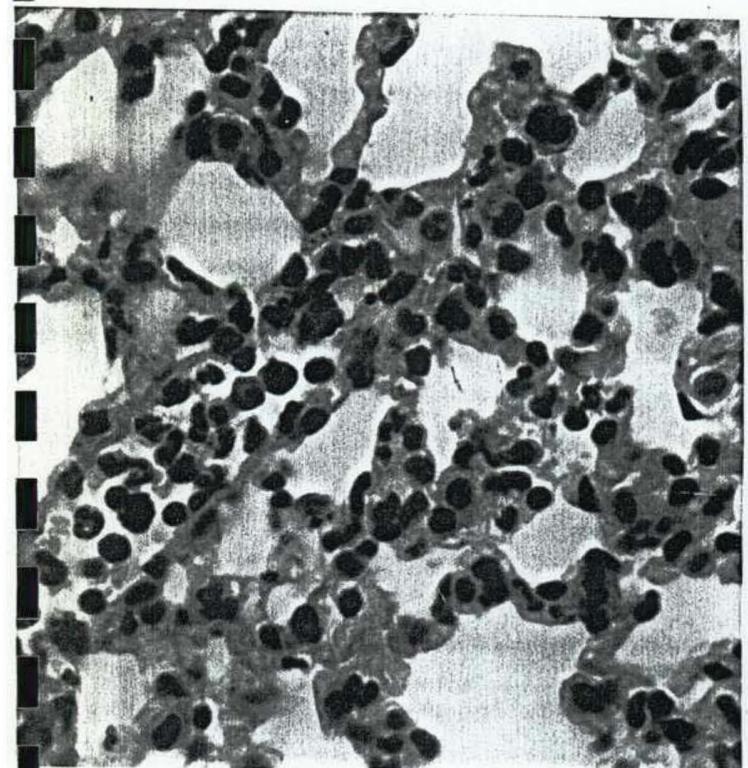
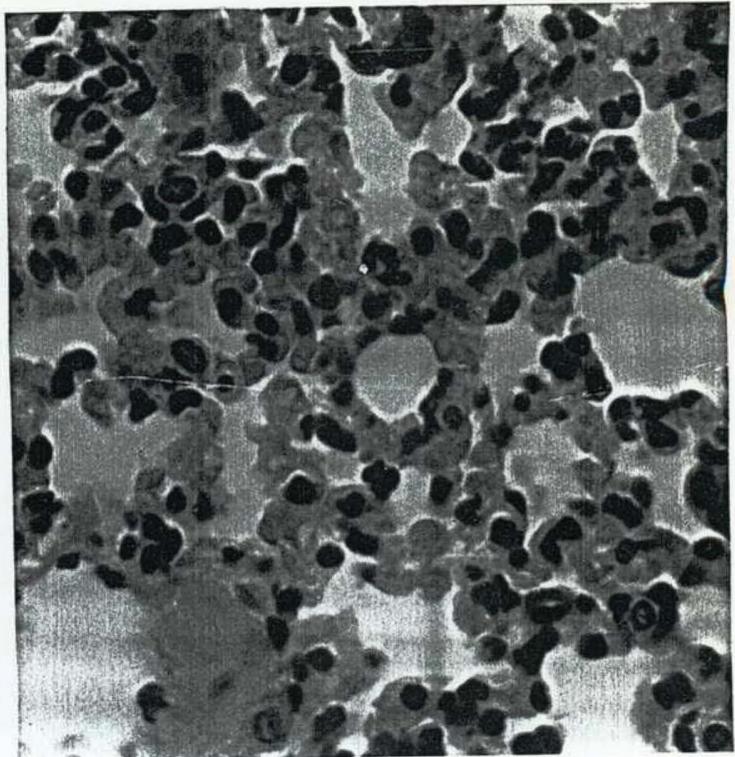
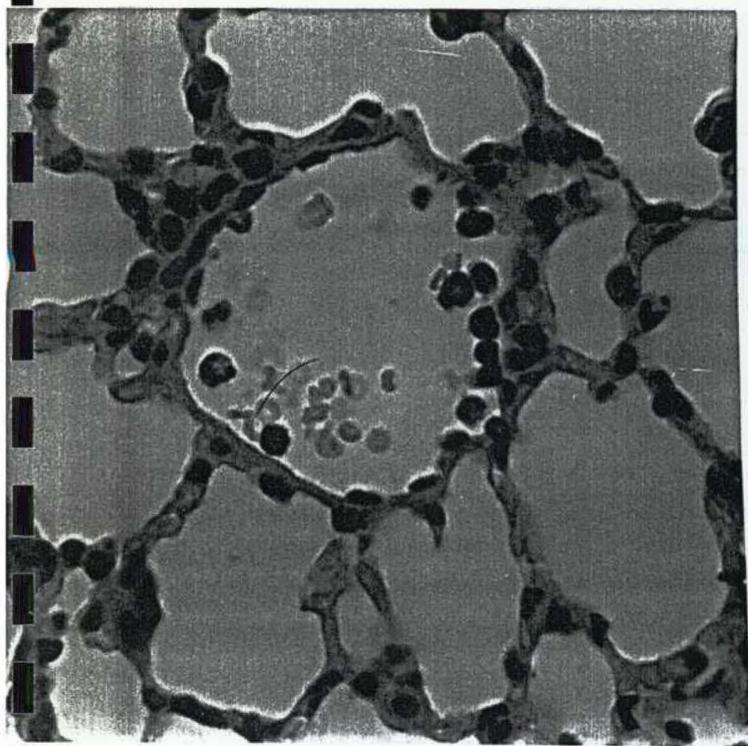
aumentarían la quimiotaxis de los PMN hacia los pulmones (*Figura 19d y e*), aunque retardando la infiltración de los mismos, dado que durante el tratamiento con lip-clod y EA, se encontraron PMN marginados paso previo a la infiltración. Es importante destacar, que este fenómeno esté asociado a la sobrevida de los animales tratados con EA.

En la *Figura 20 (a, b, c, d, e)* se muestran el hígado de los animales Control, E, EA, E + Lip-clod, y EA + Lip-clod. Podemos observar que sólo en el caso del tratamiento con el complejo bacteria-anticuerpo existe un claro deterioro de este órgano, manifestado por la pérdida de citoarquitectura y la degeneración hepatocitaria. En el resto de los casos, la histopatología difiere levemente del control. A través de la técnica utilizada, no fue posible distinguir la presencia de PMN en hígado.









10.- Cuantificación de Mieloperoxidasa:

Los PMN poseen en el citoplasma de la célula, unos gránulos azurófilos o gránulos primarios que contienen lisozima, elastasa, mieloperóxidasa (MPO) y varias proteínas catiónicas que poseen actividad antibacteriana. La enzima MPO cuando está en presencia de un ion como el Cl^- transforma el H_2O_2 en HOCl^- ; que es un poderoso agente oxidante y antimicrobiano. Como ésta enzima es característica de los polimorfonucleares, se cuantificó la mieloperoxidasa presente en pulmón, e hígado de animales inoculados con E o EA a las 3 hs. p.i. Esta medición indicaría la presencia y actividad por parte de los PMN y a su vez, si el daño tisular observado al mismo tiempo en hígado podía acreditarse a una posible infiltración de los neutrófilos a dicho órgano.

Para realizar esta experiencia, los animales fueron inoculados por vía endovenosa con E o EA o SF (el control) en la dosis utilizada para *clearance*, y a las 3 hs. p.i. se les tomó una muestra de sangre y se les extrajeron los pulmones y el hígado. La muestras fueron procesadas tal como de indicara en Materiales y Métodos y la cantidad de MPO presente en cada una de ellas se midió en un contador Elisa a 490 nm, y se expresó el contenido de MPO como cambio en la absorbancia a 490 nm ($\text{MPO } \Delta_{490\text{nm}}$).

Los resultados obtenidos nos permiten confirmar que el tratamiento con bacteria no induciría una mayor infiltración de PMN al hígado: ya que no se encontraron diferencias significativas, respecto del control (sin bacteria): $\text{MPO } \Delta_{490\text{nm}}$: Control: (1.49 ± 0.05) , E: (1.48 ± 0.06) n=6; pero en el pulmón si se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento con bacteria y el control. $\text{MPO } \Delta_{490\text{nm}}$: Control: (0.2 ± 0.014) , E: (0.33 ± 0.013) ; n=6, $p < 0.0001$. El tratamiento con EA, induce un claro y significativo aumento de la concentración de la enzima MPO, tanto en hígado comparado tanto con el control: $\text{MPO } \Delta_{490\text{nm}}$: Control: (1.49 ± 0.05) , EA: (2.14 ± 0.17) ; n=6, $p < 0.0055$, y comparando bacteria con bacteria-anticuerpo $\text{MPO } \Delta_{490\text{nm}}$: E: (1.48 ± 0.06) ; EA: (2.14 ± 0.17) ; n=6, $p < 0.004$, siendo en ambos casos muy significativo.

La cuantificación de MPO en pulmón de los animales inoculados con EA también mostraron

-Resultados-

un alto número de PMN que fue extremadamente significativo respecto al control MPO $\Delta_{490\text{nm}}$: Control: (0,2±0.014), EA: (0,39± 0.018); n=6, p <0,0001, y significativo, comparando EA con E: MPO $\Delta_{490\text{nm}}$: EA: (0,39± 0.018); E: (0,33± 0,13); n=6, p <0,025.

E.- DISCUSIÓN:

A lo largo del presente trabajo se analizó en un modelo murino la participación del sistema mononuclear fagocítico, en el *clearance* de *Escherichia. coli* O111:B4. Previamente habíamos demostrado que los LPS inducían un significativo aumento de los mecanismos de *clearance* dependientes del receptor para la porción Fc de las IgG (RFc γ) presentes en las membranas de las células fagocíticas (116). Esto se traducía en un marcado aumento de la desaparición de la circulación de complejos inmunes particulados formados por eritrocitos singenéticos y anticuerpos IgG específicos, así como una destrucción rápida y eficiente de los mismos en el bazo.

Considerando estos antecedentes estudiamos comparativamente la bacteria en ausencia o presencia de anticuerpos específicos de tipo IgG inoculada directamente a la vía sistémica. De esta manera se evaluó la participación de los distintos tipos celulares y su influencia en la distribución diferencial en los órganos según se haya inoculado bacteria o el complejo bacteria-anticuerpo. Para todos los estudios se utilizaron bacterias formoladas, para analizar los fenómenos inmunológicos de captación y destrucción de la bacteria sin que interfiera la cinética de multiplicación bacteriana. La combinación de técnicas de marcación con radioactivo y fluorescencia nos permitió analizar cuantitativamente el órgano de captación y la población involucrada respectivamente.

Los estudios cinéticos en sangre periférica demuestran que los anticuerpos inducen un marcado aumento en la velocidad de *clearance* de la bacteria. Esta afirmación es válida no solo cuando la bacteria es sensibilizada *in vitro* previo a su inoculación, sino también cuando el complejo bacteria-anticuerpo se formó *in vivo*, por inoculación de la bacteria en animales previamente inmunizados.

La desaparición veloz de la bacteria-anticuerpo de la sangre periférica se correlaciona a su vez con distintos fenómenos:

- 1)- Aumento de la captación de bacteria en pulmón
- 2)- Mayor afluencia de neutrófilos a dicho órgano, expresando una alta capacidad fagocítica.
- 3)- A concentraciones bajas de bacterias, el anticuerpo indujo una mayor sobrevida y una rápida recuperación de los animales.

El papel beneficioso u adverso de la migración de los neutrófilos a los distintos órganos es aún ampliamente discutido. Ciertas evidencias indicarían que la presencia de PMN en el hígado es uno de los mecanismos involucrados en el daño tisular hepático asociado a la muerte durante el shock séptico. De este modo ratones deficientes en la molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1), el contra-receptor para la integrina CD11b/CD18 de los PMN, están protegidos de la muerte por altas dosis de LPS. Esto se correlacionó con una disminución de la migración de los PMN al hígado (107). Sin embargo es de destacar las profundas diferencias que existen entre los efectos de la inoculación de LPS purificado y bacteria enteras (120).

Luego de la entrada a la circulación el LPS experimenta una hidrólisis y metabolismo limitados y es depurado principalmente por el hígado. La forma física en la cual la endotoxina es presentada en el animal, determina como será manipulado por el hígado. Si es presentado como bacteria viva, la endotoxina es localizada en las células de Kupffer, y si el LPS está purificado de estas mismas bacterias e inyectado directamente en el animal, se localizará en los hepatocitos (107). El *clearance* del LPS purificado ocurre supuestamente a través de ciertos (scavenger) receptores sobre los hepatocitos. Estos receptores eliminan la endotoxina que ha sido químicamente modificada por el cuerpo y por lipoproteínas que la transportan (107).

Similarmente, la mayoría de los organismos que entran al torrente sanguíneo son eliminados rápidamente de la circulación por el hígado. Los estudios en este tema se han focalizado principalmente sobre la participación de los macrófagos residentes en este tejido, las células de Kupffer (108, 121). Sin embargo hay poca evidencia directa que demuestre la participación de los macrófagos hepáticos en el *clearance* de bacteria inoculada a la vía sistémica (108). Contrariamente se ha encontrado en ratones cuyos neutrófilos fueron eliminados, una disminuida capacidad de eliminar *E. coli*, que habían sido depositados en el hígado y pegados a la superficie de células hepáticas. Estos descubrimientos indicarían que la mayoría de las bacterias inoculadas por vía endovenosa y atrapadas por el hígado son eliminadas por neutrófilos inmigrantes que son rápidamente movilizados en respuesta a la infección (108).

Nuestro resultados también destacan la alta capacidad bactericida que poseen

los PMN respecto a los macrófagos residentes en hígado y bazo. En efecto, mientras en estos órganos se observan una alta persistencia de las bacterias a lo largo del tiempo (por lo menos 48 hs.); en pulmón la desaparición es tan rápida que ya a las 24 hs., prácticamente se ha eliminado el 100% de lo captado (Figuras 3, 4 y 5 respectivamente). Estas diferencias podrían estar relacionadas con la capacidad de las bacterias y los productos celulares a inducir la activación de macrófagos y/o el reclutamiento de PMN. Un modelo propuesto sobre la respuesta del huésped a *P. aeruginosa* en infecciones al pulmón ha sugerido que los macrófagos alveolares podrían ser los primeros en activarse, y los PMN podrían ser reclutados y podrían experimentar un proceso de activación para eliminar a la bacteria (122). Nuestros resultados sugieren que el *clearance* en pulmón de bacteria sensibilizada con anticuerpos, depende del reclutamiento de un alto número de PMN al sitio de infección y del proceso de activación de las células fagocíticas inflamatorias. La observación simultánea de que el proceso de eliminación de la bacteria, y la aparición de PMN a los sitios de captación de la misma (y la observada neutropenia observada en circulación minutos después de la inoculación de E o EA), sugieren fuertemente que los PMN poseen un papel fundamental en la resolución de la infección.

Es sabido que los MØ, además de su papel como efector celular fagocítico, posee un rol central en la regulación de la respuesta inmune innata actuando como célula presentadora de antígenos (CPA), y por su complejo patrón de secreción de citoquinas. Los patógenos que entran al cuerpo son atrapados por los MØ residentes ampliamente distribuidos, tales como los MØ alveolares, en el tracto respiratorio, o en las células de Kupffer, en el hígado. La interacción entre éstas células y un agente patógeno pueden iniciar la inflamación. Más aún, los MØ pueden directamente influenciar el desarrollo de la respuesta inflamatoria vía la liberación de factores quimiotácticos, tales como la IL-8, leucotrieno B4 y el componente del complemento C5a, o vía factores activadores como el factor de necrosis tumoral (TNF- α). El descubrimiento de que los macrófagos producen varia citoquinas inmunoregulatorias, indican que la producción de citoquinas por los macrófagos está más probablemente involucrada en la regulación de la inmunidad que la fagocitosis en si misma (124). Así mismo ha sido determinado que la capacidad de los macrófagos alveolares residentes de fagocitar bacteria es bastante limitado y que no poseen un destacado papel

bactericida *in vivo*, enfatizando su rol como productor de citoquinas y otros productos capaces de reclutar PMN a los sitios aéreos infectados. (125).

Ha sido demostrado que el TNF- α induce la migración de neutrófilos a través de las células endoteliales, y también induce la migración transepitelial, por un mecanismo que podría estar mediado por la sobre expresión de moléculas de adhesión (31). El TNF- α parece estimular a las células epiteliales del pulmón a producir rápidamente factores quimiotácticos solubles, como la IL-8, el cual resulta en una significante quimiotaxis de neutrófilos a través de las barreras celulares epiteliales.

Otro mecanismo que podría contribuir a la migración de los PMN al pulmón es la adherencia de los complejos bacteria-anticuerpo al endotelio de los pequeños vasos de la circulación pulmonar. Dicha interacción podría también activar al endotelio, produciendo consecuentemente diversos factores inflamatorios quimiotácticos (PAF; IL-8, etc.). En el modelo utilizado, observamos que los PMN que migran a los tejidos provienen del pool de neutrófilos circulantes. La profunda neutropenia observada a los pocos minutos de inoculada la bacteria, se asoció a un aumento en el porcentaje de los PMN en los órganos involucrados en el *clearance* (Figura 13, 14, 15, 16).

Se ha propuesto un mecanismo para explicar la observación de que inmediatamente después de la infusión de LPS existe una fase inicial de neutropenia. Por exposición al LPS, las plaquetas y las células endoteliales expresan rápidamente una adhesina: la P-selectina, la cual disminuye la circulación de los PMN cercanos a la superficie de las células endoteliales. El factor de activación plaquetario (PAF), es expresado también rápida y reversiblemente por las células endoteliales induciendo la expresión de integrinas en la superficie de los PMN que promueven la fuerte adherencia de estas células al endotelio, por unión al receptor expresado en la célula endotelial ICAM-1 (107).

Este mecanismo probablemente sea el mismo propuesto para la neutropenia por inoculación de LPS (107). Es decir una sobreexpresión secuencial de moléculas de adhesión en PMN, endotelio y plaquetas que promueven el enlentecimiento del flujo de PMN, la marginación de los mismos y por último la adherencia al endotelio para permitir la

“transmigración” e infiltración tisular. Una vez en los tejidos los PMN inician poderosos mecanismos de destrucción como son la activación del estallido respiratorio y la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO), y a través de diferentes mecanismos, la generación de intermediarios reactivos del nitrógeno, tal como el óxido nítrico NO. La activación de los MØ o de los PMN estimula la producción del radical superóxido (O_2^-), y otros IRO, (por ejemplo: peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que son rápidamente formados por este precursor por un proceso de descomposición. Los PMN forman principalmente ácido hipocloroso (HOCl), el cual también parece tener una importante función microbicida. El HOCl es formado a partir de H_2O_2 y Cl^- , en una reacción catalizada por la enzima mieloperoxidasa (MPO). Aunque la MPO está también presente en los monocitos, esta enzima está ausente en los MØ, y al menos en los roedores el NO puede jugar un rol microbicida en MØ (123). Durante la fagocitosis, los PMN se degranulan y liberan MPO en el ambiente extracelular. Existen varios informes acerca de que la MPO externa puede regular un número de funciones de los MØ, incluyendo un aumento de la fagocitosis bacteriana y aumentando la destrucción intracelular de la misma como así también induciendo a la liberación de IRO , TNF- α e interferón- γ (IF- γ).

Considerando que la activación de complemento conduce a la generación de poderosos estímulos quimiotácticos para el reclutamiento de neutrófilos, evaluamos la participación de este sistema en los fenómenos de *clearance*. Para ello realizamos inyecciones seriadas de factor anti complementario de veneno de cobra (FVC), produciendo una activación exhaustiva del sistema de complemento por activación de la vía alternativa de complemento (14). A través de este esquema experimental se eliminan los productos generados por la activación del complemento. Los resultados demostraron que el tratamiento con FVC, no modificó sustancialmente el *clearance* de EA, aunque si bloqueó significativamente el atrapamiento en pulmón. Podemos concluir que en la migración de neutrófilos al pulmón al inocular el complejo bacteria-anticuerpo, los factores de complemento juegan un papel destacado. El hígado y el bazo compensaron la disminución de la captación por los pulmones, no afectando la velocidad de *clearance* de circulación.

Contrariamente el tratamiento con FVC disminuyó significativamente la

velocidad de *clearance* de la bacteria sin sensibilizar, sugiriendo que en este caso, el complemento tendría un papel importante como opsonina de la bacteria, facilitando la adherencia a células macrofágicas y/o neutrófilos.

Es bien sabido que aquellos individuos que sufren una deficiencia de uno de los componentes centrales del complemento (C3), están sujetos a repetidas infecciones bacterianas, como así también lo sufren aquellos deficientes de anticuerpos. A su vez, ambos resultados vistos en conjunto dan sustento a la hipótesis que los complejos bacteria-anticuerpo son fagocitados por interacción de las IgG con sus RFcy sobre las células del sistema retículo endotelial (SRE) y/o PMN.

Existen evidencias claras de que los productos de complemento pueden causar eventos de transducción de señales en las células endoteliales. El C1q, bajo condiciones especiales, reacciona con las células endoteliales de manera que facilita la sobre expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y E-selectinas. La células endoteliales poseen sitios de alta afinidad para el binding de C5a, y de la interacción se producen tres respuestas funcionales:

- a- expresión en superficie de P-selectinas,
- b- secreción del factor de von Willebrand
- c- generación de O₂

Estos mecanismo tienen como fin último aumentar la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales, por lo tanto el C5a es crucial para el influjo de neutrófilos por medio de su actividad quimiotactica(14). Sin embargo existen evidencias en ratones deficientes del C5a, que han demostrado claramente que muchas bacterias Gram negativas, tales como *P. aeruginosa* inducen el reclutamiento de PMN al pulmón vía procesos de activación dependientes de CD11b/CD18 más que de la activación de C5a (122). Para bloquear dicha migración de PMN, diferentes autores han utilizado la inoculación sistémica del anticuerpo monoclonal anti CD11b/CD18 (anti Mac-1), por interacción del CD11b/CD18 a su contra receptor ICAM-1 en el endotelio. Siguiendo esta metodología, para evaluar la participación de las moléculas de adhesión en la migración de neutrófilos en respuesta a la

inoculación de bacteria o bacteria-anticuerpo, inoculamos anticuerpo monoclonal donado por la Dra. Francoise LePault de la Unidad 1461 CNRS URA, Hospital Necker, Francia. Los resultados obtenidos muestran que la captación de bacteria-anticuerpo por el pulmón está disminuida, aunque sin observarse diferencias significativas en la cinética de depuración de sangre periférica. Estos datos; sugieren que en la migración de los neutrófilos al pulmón luego de la inoculación de EA, participan activamente los mecanismos dependientes de las adhesinas.

Los resultados obtenidos por tratamiento con FVC y anti Mac-1, sugieren que al impedirse a los PMN circulantes migrar al pulmón, los complejos EA se distribuyen en los otros órganos del SRE, hígado y bazo. Debido a que el bloqueo de la migración de neutrófilos al pulmón inhibe la captación de los complejos EA, deducimos que al menos parte de dichos complejos son llevados a dicho órgano post fagocitosis en sangre periférica y que tal vez el mismo proceso de fagocitosis induce cambios en los PMN que afectan su migración dirigiéndolos principalmente a los pulmones.

Esta conclusión coincide con las evidencias arrojadas por los experimentos de fagocitosis *in vitro* e *in vivo*. Efectivamente la sensibilización de la bacteria aumenta la eficacia fagocítica de los neutrófilos, en concordancia con lo descripto por distintos autores desde hace varios años (88, 96, 117). Sin embargo, el hecho de que en periferia se encuentre un menor porcentaje de PMN y menores porcentajes de fagocitosis, sugiere que ha habido una migración desde la periferia hacia los órganos de los PMN que han fagocitado.

Por último analizamos los efectos biológicos producidos por el complejo bacteria-anticuerpo a diferentes masas de bacteria. Por inoculación de distinto número de bacteria, encontramos que a bajas dosis ($1,08 \times 10^{10}$ bacterias/200 μ l) el anticuerpo induce un efecto protector en la sobrevida de los animales al compararse con los aquellos inoculados con bacteria sola. En cambio, al aumentar las masas de bacteria (entre $1,8 \times 10^{10}$ bacterias/200 μ l y $2,7 \times 10^{10}$ bacterias/200 μ l) se manifestó el efecto nocivo de la presencia de anticuerpos, ya que la mortalidad fue superior al 50% durante las tres primeras horas, mientras que por inoculación única de bacteria, la mortalidad de los animales no se produjo antes de las 24 hs. Los efectos tóxicos manifestados por altas dosis del complejo EA se

evaluaron por histopatología. A través de estos estudios pudo determinarse que la presencia de anticuerpos induce una clara afluencia e infiltración de PMN al pulmón induciendo el colapso y la pérdida de la citoarquitectura del mismo, con manifestación de fenómenos edematosos, que en conjunto indicarían que la muerte observada pudo deberse a una bronconeumonía o a un shock anafiláctico. El hígado de estos animales presentaron necrosis y otros fenómenos asociados, como pérdida de la citoarquitectura, aunque ésta no fue tan generalizada como la vista en pulmón, indicando que el hígado no podría estar involucrado en la muerte tan rápida y temprana manifestada por los animales inoculados con EA. Por inoculación de bacteria sola, y en todo el rango de dosis estudiadas para EA, no se observaron ninguno de estos fenómenos descriptos anteriormente.

Al tratar previamente a los ratones con Lip-clod, que a las dosis inoculadas solo elimina a los macrófagos hepáticos y esplénicos, encontramos que si bien los efectos inducidos por esta droga no modifican la mortalidad de los animales inoculados con bacteria, es en cambio, determinante en la sobrevida de aquellos inoculados con EA. Observamos que por eliminación de los macrófagos hepáticos y esplénicos, la sobrevida del grupo EA es del 100 % aún superadas las 72 hs. p.i. Al realizar los estudios de histopatología, se demostró que por tratamiento con Lip-clod, si bien el número de neutrófilos en pulmón, fue prácticamente el mismo que en los controles (sin Lip-clod y con EA) los fenómenos de infiltración se vieron marcadamente retardados ya que se observó un número importante de PMN marginales, no vistos en los controles. Esto indicaría que la mortalidad estaría asociada a la infiltración de los PMN al pulmón, los que posiblemente induzcan el daño tisular encontrado en el mismo. Así mismo, el hígado de los animales tratados con Lip-clod y EA no presentaron los marcados fenómenos necróticos manifestados con EA. En conjunto estos resultados sugieren que los macrófagos alveolares, serían capaces de reclutar el mismo número de PMN que cuando todas las poblaciones macrofágicas se encontraban intactas, aunque que sería necesario algún tipo de señal proporcionada por la vía sistémica, para determinar la infiltración de los PMN, ya que estos se encontraron mayoritariamente marginales. Este retardo en el proceso de infiltración es la que probablemente haya disminuido tan notablemente los efectos tóxicos que inducían la muerte en los animales tratados con EA. Nosotros proponemos que en los ratones inoculados con Lip-clod, los macrófagos alveolares, probablemente no producen el nivel de citoquinas específicas necesarias para la inducción de una expresión aumentada de moléculas

de adhesión las cuales podrían luego permitir la posterior extravasación de los PMN a los espacios aéreos. En este contexto, el tratamiento es altamente efectivo en reducir la intensidad de la respuesta inflamatoria y el daño pulmonar inducida por complejos inmunes de IgG, de manera de estar asociada con una disminución del influjo de neutrófilos (14).

Así como fue definido por Coombs & Gell, las reacciones de hipersensibilidad han sido divididas en cuatro tipos:

a)- Reacciones de Tipo I, incluyendo la anafilaxis, están definidas como la hipersensibilidad inmediata mediada por anticuerpos IgE adheridos a los mastocitos.

b)- Reacciones de Tipo II, que son citotoxicidades dependientes de anticuerpos o complemento mediadas por la interacción de anticuerpos IgM o IgG adheridas al antígeno.

c)- Reacciones de Tipo III, también conocidas como daño tisular mediado por complejos inmunes antígeno-IgG y complemento activado.

Informes recientes han demostrado el importante papel del RFc γ en la iniciación las reacciones inflamatorias de tipo II y III (126). En trabajos realizados en modelos murinos, deficientes en CD40 (que carecen del switch de inmunoglobulinas), se ha comprobado que la IgG desempeña un importante papel en disparar las reacciones de hipersensibilidad independientes de IgE (L), mediadas por el RFc γ III, indicando el rol destacado de otras células en las cuales este receptor están presentes además de los mastocitos.

Miyajima *et al.* han demostrado que tanto la IgE, el RFc ϵ I y/o los mastocitos pueden contribuir a algunas de las patofisiologías de la anafilaxis sistémica activa en ratón, pero que la mortalidad temprana, asociada a la anafilaxis activa es dependiente de la cadena RFc γ , pero no a la RFc ϵ I, sugiriendo que la mortalidad; estaría asociada a una anafilaxis mediada principalmente con anticuerpos IgG I y RFc γ III (109).

Así mismo el factor de activación plaquetario (PAF) es un potente mediador fosfolipídico que posee diversas actividades biológicas, además de promover la agregación plaquetaria, incluyendo además la constrictión aérea, la hipotensión, la permeabilidad vascular, la anafilaxis. Los macrófagos, además de los mastocitos y basófilos son capaces de producir grandes cantidades de PAF que es liberada a la circulación. Esto lleva (luego del

estímulo por LPS), a la hipotensión, injuria tisular y frecuentemente a la muerte, como es el caso de la anafilaxia. El PAF actúa a través de su receptor (RPAF) que se expresa entre otros, en los neutrófilos. A través de la interacción PAF-RPAF se inducen la movilización de Calcio en los PMN, y la hipotensión sistémica (127). En este contexto, podemos especular que la muerte temprana presentada por inoculación de altas dosis de EA, podría ser mediada por el PAF el cual induce una shock anafilácticodebido a la interacción entre el Fc y su receptor en las células fagocíticas.

F. CONCLUSIONES:

- 1.- La velocidad de *clearance* de bacteria sensibilizada con anticuerpos es significativamente mayor que la de bacteria y está mediada probablemente por el RFcy. Está asociada además con una localización diferencial en los órganos. En cambio el *clearance* de bacteria es dependiente de la activación de complemento.
- 2.- El complejo EA formado tanto *in vivo* como *in vitro* es captado principalmente por el hígado y el pulmón a tiempos tempranos, en cambio en igual período la bacteria sin sensibilizar es atrapada por el hígado y el bazo.
- 3.- La activación del sistema complemento tiene influencia sobre la velocidad de *clearance* de bacterias, y su localización en el hígado, pero no modifica la captación en el bazo. En cambio ejerce una clara influencia sobre la captación de EA en pulmón, de forma tal que la depleción del mismo modifica la distribución de EA dirigiéndola hacia el bazo.
- 4.- La mortalidad de los animales inoculados con E, en todo el rango de dosis empleadas, estaría asociada al desarrollo del shock séptico. En cambio el tratamiento con EA sería beneficioso solo a bajas dosis del complejo, ya que a altas, se produce la muerte temprana que solo es revertida por la ausencia de macrófagos hepáticos y esplénicos. Este fenómeno no estaría asociado con la localización del complejo en pulmón, ya que frente al tratamiento con Cl2MDP este órgano llega a secuestrar el 50 % más de bacteria o bacteria-anticuerpo.
- 5.- La alta tasa de mortalidad observada por inoculación de EA, a tiempos cortos no estaría asociada tampoco a una mayor o mas sostenida producción de TNF- α durante el período de estudio.
- 6.- Finalmente, las diferencias encontradas entre E y EA, se deben a la participación diferencial de los PMN. Comprobamos que, la migración de PMN al pulmón en animales inoculados con EA es significativamente mayor que por exposición a la bacteria, y que estos no ejercen en sí mismos un efecto tóxico en este tejido, sino que los fenómenos de necrosis y degeneración observados en este órgano estarían asociados posiblemente a la liberación de alguna citoquina secretada y liberada masivamente por los MO hepáticos y esplénicos a la vía sistémica.
- 7.- La migración de PMN al pulmón, es dependiente de CD11b/CD18, cuando la bacteria es sensibilizada con anticuerpos específicos.
- 8.- Los estudios de histopatología confirman que la mortalidad temprana observada en tras la

inoculación de EA estarían asociados al desarrollo de un Distres respiratorio.

G-. Referencias:

- 1- Halma, C., Daha, M.R., Vans Es L.A.
In vivo *clearance* by the mononuclear phagocyte system in humans: an overview of methods and their interpretation.
Clin. Exp. Immunol. 89:1, 1992.
- 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- Galin, J. I.
Inflammation
En Fundamental Immunology III, ed. Paul, W. E.
Raven Press, New York, 1993, pp. 1015
- 5- Theofilopoulos, A.; Dixon, F.
Immune complexes in human diseases.
Am. J. Pathol. 100: 531, 1980.
- 6- Cooper, N.
El sistema complemento.
En "Inmunología básica clínica". Ed. El manual moderno, Mexico, pp. 119-131, 1985.
- 7- Harrison, R. A. & Lachmann, P.
The physiological breakdown of the third component of complement.
Mol. Immunol. 17: 9-20, 1980.
- 8- Chenoweth, D. E. & Hugh, T.
Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes. Proc. Natl. Acad. Sci., 75:3943-3947, 1978.
- 9- Gorski, J. P.; Hugh, T. E. & Muller-Zberhard, H, J.
C4a: The third anaphylotoxin of the human complement system.
Proc. Natl. Acad. Sci 75: 3943-3947, 1978.
- 10- Nussenzweig, V.
Interaction between complement and immune complexes. Role of complement in containing immune complexes damage.
En: "Progress in Immunology". IV. Ed: M. Fougereau, M. & Dasset,

J. Academic Press, N. Y.; pp. 1044-1056, 1980.

11- Borsos, I. & Rapp, H. J.

Complement fixation on cell surfaces by 19 and 7 antibodies.

Science, 150:505-506, 1965.

12- Mayer, M. M; Michaels, D. W.; Ramm, L. E; Whitlow, M. B.; Willoughby, J. B. & Shin, M. L.

Membrane damage by complement.

Crit. Rev. Inmunol. 2: 133-166, 1981.

13- Schneck, J.; Rosen, O. M; Diamond, B. & Bloom, B. R.

Modulation of Fc-receptor expression and Fc-mediated phagocytosis in variants of a macrophage-like cell line.

J. Immunol. 126: 75-749, 1981.

14- Peter A. Ward.

Role of Complement in Lung Inflammatory Injury.

Am J Pathol 1996, 149:1081-1086

15- Williams, R., Watson, G., Rotsein, O., Nathens, A., Parodo, J. and Marshall, J.

Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement.

J. Immunol. 158:945, 1997.

16- Imhof, B. and Dunon, D.

Leukocyte migration and Adhesion.

Advanced in Immunology. 85, 345-416, 1995.

17- Cahill, R., Poskitt, D., Frost, H and Trnka, Z.

Two distinct pools of recirculating T lymphocytes: Migratory characteristics of nodal and intestinal T lymphocytes.

J. Exp. Med. 145:420, 1977.

18- Springer, T.

Traffic signals on endothelium for Lymphocyte recirculation and leukocyte emigration.

Annu. Rev. Physiol. 57:827, 1995.

19- Springer, T.

Adhesion receptors of the immune system.

Nature 346: 425, 1990.

20- Carlos, T. and Harlan, J.

Leukocyte-endothelial adhesion molecules.

Blood 84:2068, 1994.

21- Rosales, C. and Juliano, R.

- Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes.
J.Leuk.Biol. 57:189, 1995.
- 22- Wahl, S., Feldman, G. y McCarthy, J.
Regulation of leukocyte adhesion and signalling in inflammation and disease.
J.Leuk.Biol. 59:789, 1996.
- 23- Bevilacqua, M., Nelson, R., Mannori, G. y Cecconi, O.
Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease.
Annu.Rev.Med. 45: 361, 1994.
- 24- Petty, H.R. y Todd III, R.F.
Integrins as promiscuous transduction devices
Immuno.Today 17: 209, 1996.
- 25- Graham, I., Gresham, H. and Brown, E.
An immobile susbset of plasma membrane Cd11b/CD18 (Mac-1) is involved in phagocytosis
of targets recognised by multiple receptors.
J. Immunol. 142:2352, 1989.
- 26- Bogomolski-Yahalom, V. y Matzner, J.
Disorders of neutrophil function
Blood Reviews 9: 183, 1995.
- 27- Gill, E.; Imaizumi, T.; Carveth H.; Topham, M.; Tarbet, E.; McIntyre, T.; Prescott, S.;
Zimmerman, G.
Bacterial lipopolysaccharide induces endothelial cells to synthesise a degranulating factor for
neutrophils.
FASEB J. 12, 673-684, 1998.
- 28- Lovas, K; knudsen, P.; Iversen O.; Benestad, H.
Sequestration patterns of transfused rat neutrophilic granulocytes under normal and
inflammatory conditions.
European J. Hematol. 50, 221-229, 1996.
- 29- Palermo, M. S.; Giordano, M.; Istoriz, M. A.
Effect of cyclophosphamide on the *clearance* of IgG-sensitised red cells in mice.
Clin. Immunol. Immunophatol. 58, 343-351, 1991.
- 30- Hashimoto, S.; Pittet, J. F.; Hong, K.; Folkesson, H.; Babgy, G.; Kobzik, L.; Frevert, C.;
Watanabe, K.; Tsurufuji, s.; Wiener-Kronish, J.
Depletion of macrophages alveolar decreases neutrophil to *Pseudomonas* airspace infections.
Am. Physiol. Soc. L819-L828, 1996.
- 31- Smart, S.; Casale, T.
Pulmonary epithelial cells facilitate TNF- α -induced neutrophil chemotaxis.
J. Immunol. 152, 4087-4094, 1994

- 32- Van Rooijen, N.; Bakker, J. & Sanders, A.
Transient suppression of macrophage functions by liposome-encapsulated drugs.
Trends in Biot. 15, 178-185, 1997.
- 33- Van Rooijen, N and Sanders.
Suppression of macrophage function.
J. Leuk. Biol. 62, 1-7, 1997.
- 34- Fainbom, L.; Satz, L.
Células efectoras de las respuesta inmune.
En: Introducción a la inmunología humana, tercera edición. Ed. del autor. Argentina, pp 209-210, 1995.
- 35- Sonnenfeld, G.
Modultion of immunity bu interferon.
Lymphokines reports. Ed. E. Pick, Academic Press, Inc., Vol 1 pp:113-132, 1980.
- 36- Schultz, M.; Papametheakis, Y & Chirigos, M.
Interferon: an inducer of macrophages activation by polyanions.
Science 197: 674-676, 1977.
- 37- Ida, S.; Hooks, J.; Siraganian, R. & Notkins, A.
Enhancement og IgE-mediated histamine release from human basophils by viruses: role of interferon.
J. Experim. Med. 145: 892-906, 1977.
- 38- Simon, P.; Farrar, J. ; Kind, P .
Biochemical relationship between murine immune interferon and a killer cell helperfactor.
J. Immunol. 122: 127-132, 1979.
- 39- Djeu, J. Heinbaugh, J.; Holden, H. Herberman, R.
Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interderon inducers.
J. Immunol. 122: 175-181, 1979.
- 40- Waltembough, C.
Specific and non specific supresor T cell factors.
Biology of the Lymphokines.Ed: S. Cohen. Academic Press, New York pp: 421, 1979.
- 41- Janeway & Travers.
Immunobology. The immue system in health and disease. Third edition. pp 7:38-7:40.
- 42- Janeway & Travers
Immunobology. The immue system in health and disease. Third edition. pp 13:1-13:3.
- 43- Van Rooijen, N.
The liposome mediated macrophage suicide tecnique.

J. Im. Meth. 124: 1-6, 1989.

44- Van Rooijen, N.

Liposome-mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications.

J. Immunol. Meth. 174: 83-93, 1994.

45- Thepen, T.; Van Rooijen, N.; Kraal, G.

Alveolar macrophage elimination in vivo es associated with an increase in pulmonary immune response in mice.

J. Exp. Med. 170, 499-509, 1989.

46- Dunn, C.; Galinet, L.; Wuh, Nugent, R.; Shachter, S. Staite, N.; Aspar, D.; Eliot, G.; Essani, N.; Rohloff, N.; Smith, N.

Demostration of novel anti-arthritic and antiinflamatory effects of diphosphonates.

J. Phasrm. Exp. Ther. 266: 1691-1698, 1993.

47- Pennanen, N; Laprinjoki, S.; Urti, A. Monkkonen, S.

Effects of liposomal and biphosphonates on IL-1 β , IL-6 and TNF- α secretion from RAW 264 cells in vitro,

Pharmaceut. res. 12: 912-922, 1995.

48- Fleish, H.

Biphosphonates: a new class of drugs in diseases of bone and calcium metabolism.

handbook Exp. Pharm. 83: 441-466, 1988.

49- Van Rooijen, N.; Van Nieuwnegen, R.

Elimination of phagocitic cells in the spleen after inrtavenous inyection of liposome encapsulated dichloromethylene-diphosphonate. An enzyme histochemical study cell tissue. Res. 238: 355-358, 1984.

50- Van Rooijen, N.; Van Nieuwnegen, R.

Elimination of phagocitic cells in the spleen after inrtavenous inyection of liposome encapsulated dichloromethylene-diphosphonate. Ultrastructural aspect of elimination of marginal zone macrophage.

Virchows Arch. D cell Pathol. 49: 375-382, 1985.

53- Däeron, M.

Fc receptor biology.

Annu. Rev. Immunol. 15: 203, 1997.

51- Williams, A.F. y Neil Barclay, A.

The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition.

Annu. Rev. Immunol. 6: 381, 1988.

53- Fridman, W.H., Bonnerot, C., Däeron, M., Amigorena, S., Teillaud, J.L. y Sautes, C.

Structural bases of Fcg Receptor functions.

Immunol. Rev. 125: 49, 1992.

54- Ravetch, J. V.

Fc receptors.

Curr. Opinion Immunol. 9: 121, 1997.

55- Wallace, P. K. M. Howell, A. L. y Fanger, M. W.

Role of Fcg Receptors in cancer and infectious disease.

J. Leukocyte Biol. 55: 816, 1994.

56- Ravetch, J. V. y Kinet J. P.

Fc receptors.

Annu. Rev. Immunol. 9: 457, 1991

57- Ravetch, J.

Fc receptors: Rubor redux.

Cell. 78: 553, 1994.

58- Fanger, M.W., Shen, L., Grazing, R. F., Guyre, P. M.

Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG.

Immunol. Today. 10: 92, 1989.

59- Speert, D.P.

Macrophages in bacterial infections.

En The macrophage, ed. Lewis, C. E. y McGee, J. O.

Oxford University Press, New York, 1992, pp.215.

60- Cooper, P.H., Mayer, P. y Baggolini, M.

Stimulation of phagocytosis in bone marrow-derived mouse macrophages by bacterial lipopolysaccharide: correlation with biochemical and functional parameters.

J. Immunol. 133:913, 1984.

61- Schifferly, J. A. Y. Taylor, R. P.

Physiological and pathological aspects of circulating immune complexes.

Kidney Internat 35:993, 1989.

62- Frank, M. M., Lawlet, T., Hamburguer, M. I. and Brown, E. J.

Immunoglobulin G Fc receptor-mediated *clearance* in autoimmune diseases.

Ann. Int. Med. 98:206, 1983.

63- Theofilopoulos, A. N and Dixon, F. J

Immunocomplexes in human diseases. A review.

Amer.J.Pathol.100: 531, 1980.

64- Walport, M. J. and Davies, K. A.

Complement and immune complexes.

Res & Immunol. 147:103, 1996.

- 65- Giroir, B. P.
Mediators for septic shock: New approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade.
Crit. Care Med 21:780, 1993.
- 66- Baumgartner, J.D., Heumann, D., Gerain, J., Weinbreck, P., Grau, G.E. and Glauser, M.
Association between protective efficacy of anti-lipopolysaccharide (LPS) antibodies and suppression of LPS-induced tumor necrosis factor α and interleukin 6; Comparison of O side chain-specific antibodies with core LPS antibodies.
J.Exp.Med.171: 889, 1990.
- 67- Salky, N. R., Mills, D., di Luzio, N. R. and Oppenheim, M. S.
Activity of the reticuloendothelial system in diseases of altered immunity.
J.Lab.Clin.Med. 66:952, 1965.
- 68- Wagner, H.N., Iio, M. and Hornick, R.B.
Studies of the reticuloendothelial system (RES). II. Changes in the phagocytic capacity of the RES in patients with certain infections.
J.Clin.Invest. 42: 427, 1963.
- 69- Schrieber, A. D.; & Frank, M. M.
Role of antibody complement in the immune clearance and destruction of erythrocytes.
I. In vivo effects of IgG and IgM complement fixing sites.
J. Clin. Invest. 51, 575-582, 1972
- 70- Schrieber, A. D.; & Frank, M. M.
Role of antibody complement in the immune clearance and destruction of erythrocytes.
II. Molecular nature of IgG and IgM complement-fixing sites and effects of their interaction with serum.
J. Clin. Invest. 51, 583-589, 1972
- 71- Fimbloom, D.; Abeles, D.; Rifai, A.; Plotz, P.
The specificity of uptake of model immune complexes and other protein aggregates by the murine reticuloendothelial system.
J. Immunol. 125: 1060-1065, 1980.
- 72- 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, New York, 1993, pp.109.
- 73- Metzger, H.
Fc receptors and the action of antibodies, ed. Metzger, H.
ASM Publications, Washington DC, 1987.
- 74- Shaw, D.R. y Griffin, F.M.

Phagocytes required repeated triggering of macrophage phagocytic receptor during particle ingestion.

Nature 289: 409, 1981.

75- Babior, B.M.

The respiratory burst oxidase.

Advances in Enzymology 65:49, 1992.

76- Test, S. T. and Weiss, S.J.

The generation of utilisation of chlorinated oxidants by human neutrophils.

Adv. Free Radical Biol. Med. 2: 91, 1986.

76- Weiss, S.

Tissue destruction by neutrophils.

New Engl. J. Med. 320: 365, 1989.

77- Hyslop, P.A., Hinshaw, D.B. y Hasley W.A.

Mechanisms of oxidant mediated cell injury: the glycolitic and mitochondria pathways of ADP phosphorilation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide.

J. Biol. Chem. 263: 1665, 1988.

78- Thomas, L.T. y Lehrer, R.I.

Human neutrophil antimicrobial activity.

Rev. Infect. Dis. 10(suppl). 2: S450, 1988.

79- Henson, P., Henson, J., Fitlschen, C., Kimani, G., Bratton, D. and Riches, D.

Phagocytic cells: degranulation and secretion.

En Inflammation: basic principles and clinical correlates. ed. Gallin, J.I., Goldstein, I.M. y Snyderman, R.

Raven Press, New York, pp363, 1988.

80- Janoff, A.

Elastase in tissue injury.

Annu. Rev. Med. 36: 207, 1985.

81-Weiss, J., Elsbach, P., Olsson, I.; Odebreg, H.

Purification and characterisation of a potent microbicidal and membrane active protein from granules of human polymorphonuclear leukocytes.

J. Biol. Chem. 253: 2664, 1978.

82- Geffner, J. R.

Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity.

En Encyclopaedia of Immunology, ed. Roitt, I.M. y Delves, P.J.

Academic Press, Londres, 1993, pp. 100.

83- Key, M. and Haskill, S.

The role of macrophage-mediated ADCC in defence against disease. A potential antitumor

- defence mechanism.
En Macrophage mediated ADCC, ed. Kore, H.S.
Marcel Dekker, Inc, 1983, pp.237.
- 84- Shore, S., Black, C., Mewicz, F., Wood, P. and Nahmias, J.
ADCC to target cells infected with type 1 and 2 HSV.
J. Immunol. 116: 194, 1976.
- 85- Thomas, J., Thomas, F., Kaplan, A. and Lee, H.
Antibody-dependent cellular cytotoxicity and chronic renal allograft rejection.
Transplantation 22: 94, 1976.
- 86- Sturm, R. and Chang, J.
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.
- 87- Sato, M., Nakamura, T. and Koyama, J.
Different abilities of two distinct Fcg receptors on guinea pig polymorphonuclear leukocytes
to trigger the arachidonic acid metabolic cascade.
FASEB letters 224:29, 1987.
- 88- Metchnikoff, E.
Immunity in infective diseases
Cambridge University Press, 1905.
- 89- Young, L.
Gram-negative sepsis.
En Principles and Practice in Infectious Diseases III ed.
Churchill Livingstone, New York, 1990, 81
- 90- Increase in National Hospital Discharge.
Survey rates of septicemia.
United States, 1979-1987. MMWR 39:31.
- 91- American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine.
Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failures and guidelines for the use of
innovative therapies in sepsis.
Crit. Care Med. 20: 864, 1992.
- 92- Bone, R.
Gram-negative sepsis. Background, clinical features and intervention.
Chest 101: 802, 1991.
- 93- Young, L. S., Stevens, P. Y Kaijser, B.
Gram-negative pathogens in septicaemic infections.
Scand. J. Infect. Dis. (Suppl.) 31: 78, 1982.

- 94- Westphal, O., Westphal, U. Y Sommer, T.
The history of pyrogen research.
En Microbiology, Schlessinger, D.
American Society of Microbiology, Washington DC, 1978, pp.221.
- 95- Nikaido, H. y Vaara, M.
Outer Membrane.
En *E. Coli* and *S. Thyphimurium*. Cellular and Molecular Biology.
American Society of Microbiology, Washington DC, 1987, pp.7.
- 96- Luderitz, O., Freudenberg, M.A., Galanos, C., Lehman, V., Rietschel, E. y Shaw, D.
Lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria.
Current Topics in Membranes and Transport 17: 79, 1982.
- 97- Rietschel, E.T., Kirikae, T., Schade, F.u., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., y Col.
Bacterial endotoxin: molecular relationships to structure to avidity and function.
FASEB J. 8:21, 1994.
- 98- Wolff, S.M.
Biological effects of bacterial endotoxin in man.
J. Infect. Dis. 128 (suppl):259, 1973.
- 99- Cannon, J.C.
Cytokines and shock.
En Cytokines and Inflammation. Kimball, E. S., ed.
CRC Press, Boca Ratón, Florida, 307, 1991.
- 100- Nathan, C.F.
Secretory products of macrophages.
J. Clin. Invest. 79: 319, 1987.
- 101- Parrillo, J.
Pathogenic mechanisms of septic shock.
En Mechanism of Disease, Epstein, F. ed.238: 1471, 1983.
- 102- Ulevitch, R.
Recognition of bacterial endotoxins by receptor-dependent mechanisms.
Adv. Immunol. 53: 267, 1993.
- 103- Hazziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M., Silker, R. and Goyert, S.
The monocyte differentiation antigen CD14, is anchored to the cell membrane by a
phosphatiylinositol linkage.
J. Immunol. 141: 547, 1988.
- 104- Tobias, P., Soldan, K. and Ulevitch, R.
Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding

- protein.
J. Biol. Chem. 264: 10867, 1989.
- 105- Stefanova, I., Horejsi, V., Ansotegui, I.J., Knapp, W. and Stockinger, H. GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. Science 254: 1016, 1991.
- 106- Lynn, W.A., Raetz, C.R.H., Qureshi, N. and Golenbock, D. Lypopolysaccharide-induced stimulation of CD11b/CD18 expression on neutrophils. Evidence of specific receptor-based response and inhibition by lipid an antagonist. J. Immunol. 147: 3072, 1991.
- 107- Cross, A. and Opal, S. Endotoxin's role in Gram-negative bacterial infection. Current Opinion in Infectious Diseases. 8: 156-163, 1995.
- 108- Gregory, S. H.; Sagnimeni, A.; Wing, E. Bacteria in the bloodstream are trapped in the liver and killed by immigrating neutrophils. J. Immunol. 157, 2514-2520, 1996.
- 109- Miyajima, I.; Dombrowicz, D.; Marin, T.; Ravetch, J.; Kinet, J.; Galli, S. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG I and Fc γ RIII. J. Clin. Investigation. 99: 901-914, 1997.
- 110-Isturiz, M.
- 111- Palermo, M; Giordano, M.; Isturiz, M. Effect of cyclophosphamide on the clearance of IgG sencitized red cells in mice. Clin. Immunol. Immunopathol. 58: 343, 1991.
- 112- Van Rooijen, N. Liposome-mediated elimination of macrophages. Liposome an d macrophage functions. pp 215- 220.
- 113- Shasby, D.; Hunninghake, G.; Endotoxin-induced pulmonary leukostasis. En: Hinshaw L.; ed. Handbook of endotoxin. New York : Elsevier Science Publishing Co. Inc. 1985: 105-28.
- 114- Klebanoff (1980). Mieloperoxidase mediated system. Edited by: A. J. Sbarra. of R.R Strauss, pp (279-308). Plenum Press, NY.
- 115- Rietschel, E. T. et al. Bacterial endotoxin: molecular relationship to structure to activity and function. FASEB J. 8, 217-225, 1994

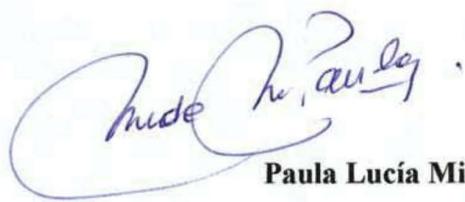
- 116- Palermo, M. S.; Alves Rosa, F.; Fernández Alonso, G; Isturiz, M. A.
Fc receptor dependent *clearance* is enhanced following LPS in vivo treatment.
Immunology 1997.
- 117- Bruce Alberts; et al.
The complement system.
En: Molecular biology of the cell, second edition. Ed: Garland Publishing, Inc. N. York & London, pp 1031-1033, 1989.
- 118- Fainboim, L.; Satz, L. M.
Sistema complemento.
En: Introducción a la inmunología humana, tercera edición. Ed. del autor. Argentina, pp 95-100, 1995.
- 119- Ramamoorthy, Ch.; Sasaki, S.; Su, D.; Sharar, S.; Harlan, J.; Winn, R.
CD18 adhesion blockade decreases bacterial clearance and neutrophil recruitment after intrapulmonary *E. coli*, but not after *S. aureus*.
J. Leuk. Biol. 61, 167-172, 1997.
- 120- Ge, Y.; Ezzell, R.; Tompkins, R.; Warren, Sh.
Cellular distribution of endotoxin after injection of chemically purified lipopolysaccharide differs from that after injection of live bacteria.
- 121- Hiraketa, Y.; et al.
Role of bacterial association with Kupffer cells in occurrence of endogenous systemic bacteremia.
Infect. Immun. 59, 289-294, 1991
- 122- Morissette, C.; Francouer, M; Darmond-Zwaig and Gervais, F.
Lung phagocyte bactericidal function in strains of mice resistant and susceptible to *Pseudomonas aeruginosa*.
Infection and Immunity. 64: 4984-4992, 1996.
- 123- Marcinkiewicz, J.
Neutrophil chloramines: missing links between innate and acquired immunity.
Immunology Today. 12, 577-580, 1997.
- 124- Salkowski, C.; Neta, R.; Wynn, T.; Strassmann, G.; Van Rooijen, N.; Vogel, S.
Effect of liposome-mediated macrophage depletion on LPS- induces cytokine gene expression and radioprotection.
J. Immunol. 155, 3168-3179, 1995.
- 125- Mulligan, M.; Warner, R.; Foreback, J.; Shanley, T. & Ward, P.
Protective effects of IL-4, IL-10, IL-12 and IL 13 in IgG imune complex inducing lung injury
J. Immunol. 159: 3483-89, 1997.
- 126- Wakayama, H. Hassegawa, Y; Kawabe, T; Saito, H.; Kikutani, H.; Shimokatam K.

IgG mediated anaphylaxis via Fc γ receptor in CD40-deficient mice

127- Ishii, S. et al.

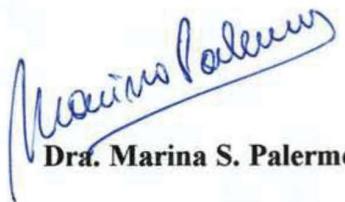
Impaired anaphylactic responses with intact sensitivity to endotoxin in mice lacking a platelet-activating factor receptor.

Firma del autor:



Paula Lucía Miliani de Marval

Firma del Director:



Dra. Marina S. Palermo.