

Tesis de Posgrado

Mecanismo del daño pulmonar inducido durante las infecciones por *P. aeruginosa*

Fontán, Patricia Alejandra

1992

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría 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 doctoral 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:

Fontán, Patricia Alejandra. (1992). Mecanismo del daño pulmonar inducido durante las infecciones por *P. aeruginosa*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2504_Fontan.pdf

Cita tipo Chicago:

Fontán, Patricia Alejandra. "Mecanismo del daño pulmonar inducido durante las infecciones por *P. aeruginosa*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2504_Fontan.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"MECANISMOS DEL DAÑO PULMONAR INDUCIDO
DURANTE LAS INFECCIONES POR P. aeruginosa"

TRABAJO DE TESIS
PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

AUTORA: LIC. PATRICIA ALEJANDRA FONTAN

DIRECTOR: DR. DANIEL OSCAR SORDELLI

AÑO 1992

Tesis
2504
y. 2.

A Ana Julia y José Juan, por aceptar
mi vocación, más allá de comprenderla.

AGRADECIMIENTOS

A mi director, Dr. Daniel Oscar Sordelli, por brindarme la oportunidad de iniciarme en la investigación científica, incentivando mi vocación en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio, por compartir con entusiasmo nuestro trabajo.

A la Dra. Stella Maris González Cappa, directora del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina, por permitir la realización de este trabajo en dicho departamento.

A todo el personal del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina, por brindarme su colaboración.

A la Dra. Christiane Dosne Pasqualini y a todo el personal de la sección Medicina Experimental, Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano Castex", Academia Nacional de Medicina, por brindarme su colaboración en el inicio de mi formación científica.

A todos aquellos que, profesional o personalmente, me brindaron su desinteresada colaboración y su afecto.

El contenido de esta tesis ha sido parcialmente publicado en:

Sordelli DO, Cerquetti MC, Fontán PA and Meiss RP. Piroxicam treatment protects mice from lethal pulmonary challenge with Pseudomonas aeruginosa. J Infect Dis 159 (2):232-238, 1989.

Fontán PA and Sordelli DO. A spectrophotometric micromethod to assess polymorphonuclear leukocyte migration induced by bacterial chemotactins in a multi-microwell Boyden chamber assembly. J Microbiol Methods, 10:225-230, 1989.

Sordelli DO, Cerquetti MC, Fontán PA and García VE. Pseudomonas aeruginosa pneumonia: treatment with non-steroidal anti-inflammatory agents to prevent lung tissue damage. En: Pseudomonas aeruginosa infection, Antimicrobial Chemotherapy. Springer Verlag, Alemania Federal, 42:247-253, 1989.

Fontán PA, Amura CR, García VE, Cerquetti MC and Sordelli DO. Pseudomonas aeruginosa chemotactins (PACs) for polymorphonuclear leukocytes: preliminary characterization. Infect Inmun (en prensa).

El presente trabajo a sido realizado con los aportes económicos de las siguientes instituciones:

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas,
(CONICET).

Laboratorio Pfizer (New York, USA).

Fundación "Alberto J. Roemmers".

CONTENIDO

Carátula.....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Referencias de publicación previa.....	iv
Aportes económicos.....	v
Abreviaturas.....	xii
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. INFECCIONES POR <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	1
1.1.1. Generalidades.....	1
1.1.2. Epidemiología.....	2
1.1.3. Incidencia e importancia de las infecciones respiratorias.....	3
1.1.4. Tratamiento y prevención.....	4
1.2. MECANISMOS DE DEFENSA DEL PULMON.....	5
1.2.1. Mecanismos no específicos.....	5
1.2.2. Mecanismos específicos.....	7
1.2.3. Factores humorales involucrados en los mecanismos de defensa pulmonar.....	8
1.3. DAÑO DE TEJIDO PULMONAR.....	10
1.3.1. Factores bacterianos	

de patogénesis e injuria tisular.....	10
1.3.2. Injuria tisular inducida	
por mecanismos del huésped.....	11
1.3.3. Interacción entre los mecanismos	
de defensa daño tisular.....	13
1.4. MODULACION FARMACOLOGICA DEL DAÑO DE PULMON.....	15
1.4.1. Antioxidantes.....	15
1.4.2. Antiinflamatorios esteroideos.....	15
1.4.3. Antiinflamatorios no esteroideos.....	16
1.5. OBJETIVO DEL PRESENTE TRABAJO.....	18
2. MATERIALES Y METODOS.....	20
2.1. Cepas y cultivos bacterianos.....	20
2.2. Ratones.....	20
2.3. Drogas antiinflamatorias.....	20
2.4. Preparación y obtención de estimulantes de LPMN.....	21
2.5. Determinación de la actividad superóxido	
dismutasa de los complejos piroxicam-Cu ²⁺	22
2.6. Obtención de las quimiotactinas de <u>P. aeruginosa</u>	22
2.7. Tratamientos físicos, químicos y enzimáticos.....	23
2.8. Preparación de la columna Dowex.....	24
2.9. Determinación de quimiotaxis in vitro.....	24
2.10. Determinación de la producción de anión superóxido.....	25

2.11. Determinación de quimioluminiscencia.....	26
2.12. Determinación de H ₂ O ₂	26
2.13. Modelo animal de neumonía por <u>P. aeruginosa</u>	27
2.14. Inducción de la quimiotaxis de LPMN.....	27
2.15. Lavados pulmonares en ratones.....	28
2.16. Citología de los líquidos de lavado pulmonar.....	29
2.17. Depuración pulmonar de <u>P. aeruginosa</u>	29
2.18. Determinación de mieloperoxidasa en homogenatos de pulmón.....	29
2.19. Determinación de proteínas solubles en líquidos de lavado pulmonar.....	30
2.20. Estudios histopatológicos.....	31
2.21. Consideraciones estadísticas.....	32
3. RESULTADOS.....	33
3.1. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD QUIMIOTACTICA BACTERIANA.....	33
3.1.1. Métodos de determinación de la quimiotaxis.....	33
3.1.2. Conclusiones parciales.....	36
3.2. CARACTERIZACION, FUNCION BIOLOGICA IN VITRO Y COMPOSICION DEL SOBRENADANTE DE CULTIVO DE <u>P. aeruginosa</u> (SBCP).....	37
3.2.1. Características físicas y químicas del SBCP.....	38
3.2.2. Función biológica in vitro del SBCP.....	40
3.2.3. Separación y purificación	

de los péptidos quimiotácticos.....	46
3.2.4. Conclusiones parciales.....	49
3.3. PAC'S: MODIFICACION DE SU ACTIVIDAD QUIMIOTACTICA IN VITRO POR IL-1 Y DAINE.....	50
3.3.1. Efecto promotor de la IL-1 sobre la quimiotaxis de LPMN.....	50
3.3.2. Efecto de DAINE sobre la quimiotaxis de LPMN in vitro...	52
3.3.3. Efecto inhibitorio de DAINE sobre la quimiotaxis de LPMN pre-estimulado con IL-1.....	54
3.3.4. Conclusiones parciales.....	56
3.4. PAC'S:EFECTO SOBRE OTRAS FUNCIONES DE LPMN.....	58
3.4.1. Producción de anión superóxido por LPMN.....	58
3.4.2. Efecto promotor de la IL-1 sobre la producción de anión superóxido por LPMN	58
3.4.3. Efecto de DAINE sobre la producción de anión superóxido por LPMN.....	59
3.4.4. Efecto inhibitorio de DAINE sobre la producción de anión superóxido por LPMN pre-estimulados con IL-1...	60
3.4.5. Producción de quimioluminiscencia de LPMN.....	61
3.4.6. Producción de H ₂ O ₂ de LPMN.....	64
3.4.7. Efecto promotor de la IL-1 sobre la producción de H ₂ O ₂ de LPMN.....	66
3.4.8. Efecto de DAINE sobre la producción de H ₂ O ₂ de LPMN.....	66

3.4.9. Conclusiones parciales.....	68
3.5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DAINE SOBRE LA INFECCION PULMONAR por <u>P. aeruginosa</u>	69
3.5.1. Respuesta celular de pulmón hacia la infección con <u>P. aeruginosa</u>	69
3.5.2. Efecto de las DAINE sobre la respuesta celular de pulmón.....	72
3.5.3. Efecto protectorio del piroxicam.....	76
3.5.4. Conclusiones parciales.....	80
3.6. EFECTO IN VIVO DEL TRATAMIENTO CON DAINE SOBRE LA QUIMIOTAXIS DE LPMN INDUCIDA POR EL SBCP.....	80
3.6.1. Efecto de las DAINE sobre la respuesta LPMN en el pulmón.....	80
3.6.2. Efecto del SBCP sobre los niveles de MPO en pulmón.....	81
3.6.3. Efecto del tratamiento con piroxicam sobre los niveles de proteínas en pulmón.....	84
3.6.4. Efecto de complejos piroxicam-cobre sobre la migración in vivo de LPMN.....	84
3.6.5. Conclusiones parciales.....	88
4. DISCUSION.....	90
4.1. CARACTERISTICAS DE LAS QUIMIOTACTINAS DE <u>P. aeruginosa</u>	90
4.2. ROL DE LAS QUIMIOTACTINAS DE <u>P. aeruginosa</u> DURANTE EL DAÑO DE TEJIDO.....	92

4.3. CONTROL FARMACOLOGICO DEL DAÑO DE TEJIDO PULMONAR.....	95
4.4. CONCLUSIONES FINALES.....	99
4.5. FUTURO.....	101
5. RESUMEN.....	103
6. BIBLIOGRAFIA.....	105

ABREVIATURAS

AA: ácido araquidónico
CSFs: factores hematopoyéticos estimuladores de colonias
DAINE: drogas anti-inflamatorias no esteroideas
FMLP: formil-metionil-leucil-fenilalanina
HBSS/c: solución salina de Hanks con Ca^{2+} y Mg^{2+}
HBSS/s: solución salina de Hanks sin Ca^{2+} y Mg^{2+}
 H_2O_2 : peróxido de hidrógeno
IL-1: interleuquina 1 beta recombinante humana
IPB: índice de infiltración peribronquial
IPV: índice de infiltración perivascular
LPMN: leucocitos polimorfonucleares
LPS: lipopolisacárido
LT: leucotrienos
MA: macrófagos alveolares
 $\text{M}\phi$: macrófagos
MPO: mieloperoxidasa
PAF: factor activador de plaquetas
PGs: prostaglandinas
SBCP: sobrenadante de cultivo de P. aeruginosa
SOD: superóxido dismutasa
TNF: factor de necrosis tumoral
UFC: unidades formadoras de colonias

Introducción

1.1. INFECCIONES POR Pseudomonas aeruginosa

1.1.1. Generalidades.

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gram-negativo, no fermentador. Aunque usualmente es aeróbico obligado, puede crecer en condiciones de anaerobiosis en presencia de nitratos que actúen como aceptores terminales de electrones. También puede vivir anaeróbicamente en presencia de arginina. La utilización de los nitratos puede explicar la capacidad de P. aeruginosa de sobrevivir en medios tales como los hospitalarios. La producción de proteasas y la utilización anaeróbica de sus productos finales, particularmente la arginina, le permite a este microorganismo infectar sitios del cuerpo humano donde el oxígeno molecular es escaso. P. aeruginosa puede multiplicarse a altas temperaturas (43°C) y puede utilizar más de cincuenta compuestos orgánicos simples para crecer. P. aeruginosa puede crecer no sólo en agua destilada, sino también en presencia de algunos desinfectantes. La característica que distingue a P. aeruginosa de otras especies de Pseudomonas es la producción de pigmentos derivados de la fenacina, tales como la piocianina, la pioquelina y la pioverdina. Estos pigmentos son metabolitos secundarios y se considera que cumplen un importante rol en la captación de fosfatos e hierro (19,1). De todas las especies de Pseudomonas, P. aeruginosa es la especie genéticamente mejor conocida, y se sabe que posee tres sistemas de recombinación genética: conjugación, transducción y transformación. Esta información tiene fundamental importancia

clínica, dado que la recombinación genética conduce al desarrollo de resistencia a los antibióticos (134).

1.1.2. Epidemiología.

P. aeruginosa es un organismo patógeno oportunista que raras veces causa infecciones en individuos normales, pero que puede causar graves infecciones en pacientes cuyos mecanismos de defensa se hallan comprometidos. La sepsis por P. aeruginosa es la principal causa de muerte en pacientes neutropénicos y distintos estudios revelan que P.aeruginosa es, además, la causa de entre el 25 y el 50% de las bacteriemias fatales. La letalidad de estas infecciones supera el 75%. P. aeruginosa es asimismo un patógeno nosocomial y es responsable del 11% de todas las infecciones hospitalarias. La neumonía por P. aeruginosa es particularmente temida en las salas de terapia intensiva (20). Según un estudio realizado durante cinco años en 1.186 casos mortales de hospitales, las bacteriemias por bacilos gram-negativos representan el 36% del total y de estas bacteriemias, en el 70% de los casos se trata de individuos infectados por Pseudomonas sp. (11). Entre junio de 1986 y mayo de 1988 se realizó un estudio ecológico de bacilos gram-negativos en las salas de terapia intensiva e intermedia y las salas generales del hospital F.J. Muñoz, de la ciudad de Buenos Aires. Los gérmenes más frecuentemente aislados fueron P. aeruginosa 55.6% y Acinetobacter calcoaceticus 17% (107). Estos resultados representan un claro indicio de la importante incidencia de los bacilos gram-negativos en las

infecciones hospitalarias en nuestro país.

1.1.3. Incidencia e importancia de las infecciones respiratorias.

La neumonía por P. aeruginosa se da con una frecuencia muy alta en pacientes leucémicos (106), pacientes con otras neoplasias y con granulocitopenia en general (3). P. aeruginosa es responsable del 50% de las neumonías fatales adquiridas en salas hospitalarias. Una gran proporción de las afecciones respiratorias son provocadas por infecciones agudas del tracto respiratorio inferior. En contraste con lo que ocurre en el tracto respiratorio superior, las infecciones de las vías bajas habitualmente constituyen una gran amenaza para la vida del huésped, especialmente en individuos con las funciones pulmonares comprometidas, como los fumadores, o aquellos con enfermedades obstructivas crónicas (20). En pacientes con fibrosis quística los porcentajes de colonización del tracto respiratorio con P. aeruginosa alcanza hasta un 80% (45). Las cepas mucoides son predominantemente encontradas en pacientes crónicamente colonizados y la frecuencia aumenta al progresar la enfermedad. La razón de la colonización por P. aeruginosa y el cambio hacia las cepas mucoides no está totalmente dilucidado aún. El 90% de la mortalidad de los pacientes con fibrosis quística se debe a la enfermedad pulmonar y a la falla cardiorrespiratoria que ella provoca. Si bien la infección de las vías respiratorias es secundaria, es la principal causa del daño irreversible del pulmón (11,43).

1.1.4. Tratamiento y prevención.

Las neumonías por P. aeruginosa son particularmente difíciles de erradicar y tienen en general un mal pronóstico (151), especialmente cuando no puede eliminarse la causa predisponente que permitió la colonización del paciente. La escasa respuesta a la terapéutica antibiótica se debe probablemente a la baja penetración de los agentes dentro de las secreciones respiratorias. Los tratamientos con carbenicilina en combinación con aminoglicósidos, así como la utilización de cefalosporinas de tercera generación han sido evaluados en distintos pacientes (45). Sin embargo, en la mayoría de los casos, P. aeruginosa tiende a persistir si no se erradica la enfermedad de base y a desarrollar cierto grado de resistencia, aún a los modernos antibióticos.

Por otra parte, en las últimas décadas, numerosos grupos de trabajo se han abocado al desarrollo de distintas vacunas para prevenir las infecciones por P.aeruginosa. La inmunoprofilaxis de las neumonías por P. aeruginosa ha sido evaluada experimentalmente en modelos animales y pacientes con alto riesgo (92). Dentro de las distintas vacunas desarrolladas, se han utilizado inmunógeno tales como las combinaciones de distintos componentes antigénicos simples (80) o combinados (21,22), el microorganismo entero muerto por calor (26), o el germen vivo atenuado (84,115). Sin embargo, las preparaciones disponibles sólo proveen un grado de protección variable y frecuentemente causan reacciones adversas debido a la toxicidad de los componentes utilizados (36).

Hasta el momento no existe una vacuna que confiera inmunidad protectora de larga duración contra las infecciones por P.aeruginosa.

1.2. MECANISMOS DE DEFENSA DEL PULMON

1.2.1. Mecanismos no específicos.

El pulmón y las vías aéreas están particularmente expuestos a los microorganismos y partículas que se encuentran en el medio ambiente. Los mecanismos no específicos de defensa del tracto respiratorio superior involucran la filtración aerodinámica, el movimiento de los fluidos del tracto respiratorio propiciado por la movilidad de las cilias y los reflejos motores (33). Aquellos contaminantes que puedan eludir los mecanismos de las vías superiores pueden ser eliminados por los mecanismos no específicos del tracto respiratorio inferior: los reflejos pulmonares, el aparato mucociliar, la detoxificación y la fagocitosis de las partículas inhaladas por los macrófagos (M ϕ) alveolares residentes. Otras importantes células fagocíticas son los leucocitos polimorfonucleares (LPMN) los cuales están en pulmón sólo en escaso número (62).

Los LPMN tienen vital importancia durante los procesos infecciosos, dado que constituyen la defensa más importante frente a la invasión por la mayoría de las bacterias patógenas (66). Los LPMN son los componentes más importantes de las defensas no

específicas del huésped contra las infecciones de las vías respiratorias bajas (103,104). La capacidad multifuncional de los LPMN involucra diferentes procesos que ocurren en dos estadios consecutivos durante la activación de la célula. Durante el primer estadio toman lugar los eventos que ocurren como en respuesta a bajas concentraciones de un estímulo inflamatorio, como el que induce un agente quimiotáctico. Este último se une a receptores específicos de alta afinidad en la membrana de los LPMN e inicia una serie de reacciones bioquímicas intracelulares que culminan en adherencia, diapedesis, emigración y quimiotaxis hacia el tejido infectado (97). Durante el segundo estadio ocurren la ingestión (fagocitosis), degranulación, actividad oxidativa (estallido respiratorio), muerte y digestión. Estas funciones se producen en respuesta a altas concentraciones de quimiotácticos, que se unen a los receptores de baja afinidad. Los factores quimiotácticos incluyen: productos solubles de la activación complemento por la vía clásica (C5a y C5a des-arg) y por la vía alternativa (C3bBb), productos solubles bacterianos, metabolitos del ácido araquidónico (AA) y el factor activador de plaquetas (PAF) (121).

La infección pulmonar por P. aeruginosa se acompaña de una severa inflamación (130). Esta inflamación se caracteriza por una profusa migración de M0 y LPMN desde la circulación. Estos dos tipos celulares, especialmente los LPMN, son imprescindibles para la efectiva contención de P. aeruginosa el pulmón (116).

Ambos tipos celulares, sin embargo, tienen la capacidad potencial de producir daño tisular a través de una variedad de mecanismos (15,49,142). De esta manera, un exceso de estas células en el pulmón pueden conducir a la destrucción de una significativa masa de tejido y a la producción de fibrosis, lo que deja una importante secuela respiratoria en aquellos pacientes que se recuperan de la neumonía.

1.2.2. Mecanismos específicos de defensa pulmonar.

Las defensas no específicas son amplificadas, dirigidas y aumentadas por la respuesta inmune específica, integrada dentro del sistema de defensa del pulmón. La inmunidad local y sistémica brindan una mayor capacidad defensiva al pulmón. Dentro de los mecanismos de defensa específicos, las respuestas inmunes locales constituyen la primera barrera de defensa de las mucosas contra la invasión por microorganismos patógenos. El tracto respiratorio cuenta con inmunoglobulinas, fundamentalmente IgA secretoria e IgG. El rol de las inmunoglobulinas en el tracto respiratorio inferior es el de neutralizar toxinas, aglutinar partículas virales y bacterianas, y preparar los microorganismos para ser ingeridos y muertos por los fagocitos (capacidad opsonizante) (57). La formación de inmunocomplejos posibilita la activación del sistema del complemento.

En comparación con lo conocido acerca de la inmunidad humoral, es poca la información disponible relacionada con la inmuni-

dad mediada por células en el pulmón. Se ha sugerido que el mecanismo por el cual la inmunidad celular se manifiesta es el de las reacciones mediadas por linfoquinas, lo que induce la acumulación y la estimulación de las células fagocíticas. El fenómeno depende en parte de la inmunocompetencia de los linfocitos T y B (3,52).

1.2.3. Factores humorales involucrados en los mecanismos de defensa pulmonar.

El AA, como otros ácidos grasos, está presente en los fosfolípidos de las membranas celulares. Cuando éstas sufren algún tipo de injuria se produce la liberación de AA y su posterior metabolización por vías enzimáticas y no enzimáticas. Mediante la enzima ciclooxigenasa, el AA se metaboliza hacia prostaglandinas (PGs) (41). Mediante la enzima lipooxigenasa el AA se metaboliza en los sulfidopéptidos leucotrienos (LTC_4 , LTD_4 , LTE_4) y en los derivados monohidroxi- y dihidroxi derivados (5-HETE y LTB_4). Estos compuestos son potentes mediadores de la inflamación y afectan profundamente la quimiotaxis y otras funciones de LPMN (39).

Las primeras funciones documentadas de PGs establecen que éstas interactúan con receptores específicos de membrana de tejidos vascular, conectivo y de las células circulantes (plaquetas, neutrófilos y $M\phi$), que intervienen en inflamación aguda y crónica (144). Se ha demostrado, por otra parte, que la metabolización

del AA inducida mediante lipopolisacárido (LPS) activaría solamente la vía de la ciclooxigenasa (59). Dado que las PGs son no sólo importantes mediadores de la respuesta inflamatoria sino además moléculas efectoras de cambios que ocurren en los tejidos durante la respuesta inflamatoria, se ha postulado que las drogas anti-inflamatorias no esteroideas (DAINE) podrían jugar un rol de importancia en la modulación de la inflamación en el órgano infectado.

Existen evidencias sobre la gran importancia de las citoquinas en la regulación de los mecanismos defensivos del pulmón. Osaki y col. han demostrado que el tratamiento con interleuquina-1-alfa (IL-1 alfa) aumenta la protección contra las infecciones pulmonares por bacilos gram-negativos en ratones. Los trabajos de Ozaki y col. (89) han establecido que el tratamiento de ratones con IL-1, 24 horas previas a la infección con P. aeruginosa, incrementa la sobrevivencia de los animales. Horvat y col. demostraron que la proteasa alcalina de bacilos gram-negativos inhibe la acción moduladora del interferón-gama (44). Este hallazgo podría explicar el efecto inmunosupresor adjudicado a algunos microorganismos. La inhibición del interferón-gamma produce un aumento de la producción de PG₂ y por consiguiente disminuye la producción de IL-1, que aparentemente protege al huésped de las infecciones bacterianas (83). Sin embargo el efecto protector de la IL-1 ha sido observado en general en huéspedes granulocitopénicos, es decir en ausencia de LPMN.

1.3. DAÑO DE TEJIDO PULMONAR

1.3.1. Factores bacterianos de patogénesis e injuria tisular.

Veinte años atrás, cuando se realizaron las primeras descripciones de las lesiones patológicas causadas por Pseudomonas sp. se aceptaba que el LPS de estas bacterias era mucho menos virulento que el de otras gram-negativas. Más tarde se encontraron numerosos exoproductos patogénicos que en su mayoría eran liberados por P. aeruginosa (30,59) y que podían explicar la severa inflamación que acompaña a las infecciones por este microorganismo. La piocianina y la 1-hidroxifenacina, pigmentos liberados por P. aeruginosa, activan el metabolismo del oxígeno y la liberación de enzimas lisosomales de LPMN (102). La leucocidina y la exotoxina A de P. aeruginosa, por otra parte, decrecen la capacidad fagocítica de los LPMN y M ϕ (9). P.aeruginosa produce una elastasa neutra que actúa como inhibidora de enzimas producidas por LPMN y que es capaz de activar el tercer componente del sistema complemento (127). Además, la liberación de antígeno soluble conduce a la formación de complejos inmunes, que han sido reconocidos como uno de los más importantes mediadores de injuria tisular (138). Si bien todos estos procesos conducen a la injuria del tejido por acción directa del microorganismo, existen otros mecanismos de destrucción de tejidos que se manifiestan durante las infecciones bacterianas.

Existe una creciente cantidad de información relacionada con

la patogénesis de las infecciones respiratorias por P. aeruginosa. Aunque bacterias de diversos géneros producen quimiotactinas in vitro (24, 109), no existe información acerca de la naturaleza de los factores producidos por P. aeruginosa que inducen la migración de fagocitos hacia el sitio de la inflamación. La actividad quimiotáctica de los sobrenadantes de cultivos de P. aeruginosa ha sido demostrada in vivo en ratones C5 deficientes y también in vitro en ausencia de suero (18). La naturaleza de las quimiotactinas no ha sido aún dilucidada. Dos tipos de quimiotactinas, por ejemplo, han sido identificadas en sobrenadantes de cultivo de E. coli. Uno de estos pertenece al grupo de los formilmetionil oligopéptidos con pesos moleculares que oscilan entre los 150 y 1500 daltons (111). El segundo pertenece al grupo de los lípidos (ácido hidroxieicosoenoico), el cual posee un parecido estructural con los leucotrienes (128).

1.3.2. Injuria tisular inducida por mecanismos del huésped.

Aunque los mecanismos defensivos del huésped son imprescindibles para proteger al pulmón de los múltiples agentes infecciosos, la activación de dichos mecanismos pueden ser causantes de daño pulmonar. Durante un proceso inflamatorio las células fagocíticas, M ϕ y LPMN liberan productos potencialmente capaces de provocar daño, tales como radicales libres derivados del oxígeno y enzimas proteolíticas (141,40,5). Con respecto a las especies tóxicas del oxígeno derivadas de células inflamatorias, aparentemente el anión superóxido tiene escaso efecto tóxico directo so-

bre el tejido. Sin embargo, puede convertirse en (peróxido de hidrógeno) H_2O_2 tanto por dismutación espontánea o por la dismutación catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Una vez formado, el H_2O_2 puede reaccionar con el hierro reducido por el anión superóxido a través de la reacción de Haber-Weiss, para formar radical oxhidrilo, especie altamente tóxica (7). En presencia de mieloperoxidasa, el H_2O_2 puede reaccionar con haluros (cloruro, por ejemplo) para formar $HClO$. Los haluros oxidados pueden reaccionar con el anión superóxido para formar radicales oxhidrilos o con el H_2O_2 para formar oxígeno singlete. El $HOCl$ pueden reaccionar con aminas, aminoácidos y péptidos para formar monocloroaminas y dicloroaminas (143).

Además de la liberación de especies reactivas del oxígeno, los LPMN liberan también gránulos lisosomales. El citoplasma de los neutrófilos contiene dos tipos de gránulos. Ellos son los gránulos primarios o azurófilos, que contienen mieloperoxidasa, proteínas catiónicas, hidrolasas ácidas (beta-glicerofosfatasa, beta-glucoronidasa, beta-galactosidasa, etc.) proteasas neutras, y algunas lisozimas. Los gránulos secundarios o específicos contienen lactoferrina, proteínas que unen vitamina B_{12} , colagenasa, fosfatasa alcalina y la mayoría de las lisozimas celulares (54). Conjuntamente con las enzimas proteolíticas, los radicales libres desnaturalizan proteínas, destruyen carbohidratos y producen la peroxidación de los lípidos. La degradación del material ingerido conduce a la muerte de los LPMN, lo cual provoca también la

liberación de una gran cantidad de radicales libres y proteasas (49,68). La exacerbación de estos mecanismos defensivos del huésped pueden conducir por si mismos al daño tisular.

1.3.3. Interacción entre los mecanismos de defensa daño tisular.

Durante una infección bacteriana, y especialmente en aquellas causadas por P. aeruginosa en las vías respiratorias bajas, los mecanismos de defensa enumerados hasta aquí suman sus efectos y, además de atacar a la bacteria inducen la destrucción del tejido pulmonar circundante. Esto resulta en una manifestación patogénica de importantes consecuencias para el huésped, quien sucumbe ante el daño irreparable, o sufre secuelas respiratorias de considerable magnitud (13).

Los LPMN y MØ pueden ser activados a través de receptores de membrana por diversos componentes bacterianos, como endotoxinas y péptidos quimiotácticos (55). Durante las infecciones pulmonares por bacterias gram-negativas, la endotoxina activa el complemento, permitiendo la liberación de quimiotactinas que estimulan a los LPMN para producir metabolitos del AA, PAF y radicales libres. Los cambios resultantes en la permeabilidad vascular y la acción de los mediadores nombrados conducen a la producción de edema pulmonar (149).

Los componentes bacterianos inducen la producción de potentes mediadores inflamatorios tales como el factores de necrosis

tumoral (TNF) alfa y beta, interleuquinas, factores hematopoyéticos estimuladores de colonias (CSFs) e interferones (82,121). Ferrante y col. han demostrado que la activación de M ϕ con Staphylococcus aureus induce la liberación de factores que activan LPMN para la liberación de especies reactivas del oxígeno y la degranulación. En experimentos realizados in vivo se demostró que la IL-1 producida por M ϕ y LPMN (16) promueve la migración celular (72). El efecto promotor de la IL-1 puede conducir, al igual que otros mediadores del huésped, al daño tisular de pulmón. Entre los mecanismos regulatorios de la inflamación pulmonar, la producción de IL-1 beta se postula como un posible mediador del desarrollo de enfermedades pulmonares, caracterizadas por el daño de tejido pulmonar inducido por LPMN (61). La IL-1 purificada de M ϕ y la IL-1-beta son promotoras de la liberación de radicales libres y actúan estimulando la respuesta de los LPMN frente a la activación de péptidos como el formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) in vitro (125). Los mecanismos a través de los cuales las citoquinas regulan estas funciones no han sido aún dilucidados. Sin embargo, se hipotetiza que podría aumentar el número o la especificidad de receptores para FMLP (29). Las funciones de la IL-1 relacionadas con inflamación y migración de células han sido estudiadas por algunos autores, quienes demostraron que esta citoquina actúa sobre las células endoteliales e induce la producción de factores quimiotácticos para LPMN, tales como la IL-8 (124).

1.4. MODULACION FARMACOLOGICA DEL DAÑO DE PULMON

1.4.1. Antioxidantes.

Muchas investigaciones han sido dirigidas a eliminar o minimizar los efectos tóxicos de los radicales libres y su contribución al daño de tejido pulmonar. Los antioxidantes enzimáticos, tales como la SOD y la catalasa han demostrado ser efectivas en aumentar la sobrevivencia de ratas expuestas a altos porcentajes de oxígeno (110). Entre los antioxidantes no enzimáticos, los tratamientos con dimetil-tiourea, N-acetilcisteína y la adición de vitamina E y C en la dieta han demostrado ser efectivos, disminuyendo la injuria pulmonar (8,12,48). Los agentes quelantes del hierro pueden inhibir también las reacciones de radicales libres, dado que el hierro cataliza la generación del radical oxhidrilo a partir de H_2O_2 y anión superóxido, como así también promover el "stress" oxidativo. Uno de estos agentes, la desferrioxamina, decrece la injuria pulmonar luego de la activación del complemento (139).

1.4.2. Antiinflamatorios esteroideos.

La principal acción de los corticosteroides reside en su capacidad de inhibir a la fosfolipasa A_2 , la enzima de membrana cuya activación conduce a la liberación de AA y PAF (104). La capacidad de los corticosteroides de prevenir la liberación de los metabolitos del AA en el pulmón es variable. La dexametasona parece tener efectos benéficos en modelos experimentales, debido

a que bloquea o reduce notablemente las anomalías hemodinámicas inducidas por endotoxina bacteriana (108). En perros anestesiados, el tratamiento con altas dosis de metilprednisolona no previene el aumento de metabolitos de la ciclooxigenasa inducida por endotoxina (35). El uso clínico de los corticosteroides durante una infección bacteriana pulmonar es aún materia de debate. El conocido efecto inmunosupresor y hormonal de los esteroides, puede ser inapropiado si se utiliza en altas dosis y en tratamientos a largo plazo. También ha sido demostrado que, en ciertas circunstancias el daño de tejido pulmonar se incrementa por efecto del tratamiento con esteroides (67).

1.4.3. Antiinflamatorios no esteroideos.

El tratamiento antiinflamatorio adjunto a la terapéutica habitual para la neumonía por P. aeruginosa ha sido sugerido recientemente (119). Dentro de los agentes con que se cuenta en la actualidad, los anti-inflamatorios no esteroideos con larga vida media en circulación aparecen como los fármacos que podrían llegar a utilizarse clínicamente. Pudo comprobarse que el tratamiento con la DAINE ibuprofen disminuye la magnitud de la migración de células al pulmón y el daño pulmonar en respuesta a la inoculación local con P. aeruginosa (120,58). Se ha comprobado que estos antiinflamatorios restauran las funciones bactericidas de los LPMN durante infecciones con P. aeruginosa (10).

Van Benthuisen y colaboradores (131) han mostrado que los

tratamientos con meclofenamato, indometacina (ambos inhibidores de la ciclooxigenasa) y tetracaina (inhibidor de la fosfolipasa A₂) previenen la injuria del tejido pulmonar inducida por acetato forbol mirístico, en pulmones perfundidos de conejos. Utsonomiya y col. han demostrado que parte de las secuelas fisiopatológicas de la aspiración de ácidos asociada con el secuestro de plaquetas y leucocitos en el pulmón puede ser revertida por el tratamiento con ibuprofen. Ha sido también demostrado que el tratamiento con metilprednisolona y ibuprofen disminuye el daño de tejido mediado por la activación del complemento, in vivo (50).

La inhibición de la producción de PGs fue originalmente considerado como el único mecanismo de acción antiinflamatoria de estas drogas (132), sin embargo en los últimos años muchos autores han podido demostrar que las DAINE inhiben las funciones de los LPMN, independientemente de la inhibición de la ciclooxigenasa (2). Existen evidencias sobre que las DAINE modularían las funciones de los LPMN tales como la migración y la liberación de especies reactivas del oxígeno (87,93,94). La modulación a través de DAINE involucraría la interacción con los receptores para FMLP (95,100,105). Existen evidencias que sugieren que los complejos de ciertas DAINE con cobre, incluyendo piroxicam, indometacina, salicilato, acetilsalicilato y D-penicilamina (63,91,145) pueden catalizar la dismutación del anión superóxido, mimetizando así la actividad de la enzima, con lo que aumentaría su capacidad inhibidora de daño tisular. La enzima SOD cataliza

la dismutación del anión superóxido en H_2O_2 y oxígeno. El H_2O_2 así formado por la reacción de Haber-Weiss reacciona para dar radical oxhidrilo. El equilibrio de esta reacción, en presencia de catalasa, es desplazado hacia la descomposición del H_2O_2 , lo que impide la acumulación de especies reactivas del oxígeno, causantes del daño tisular.

Dado que las DAINE ofrecen ciertas ventajas sobre los antiinflamatorios esteroideos, con respecto a la toxicidad y a los efectos secundarios, estas drogas podría ser usadas con éxito en la prevención del daño de tejido pulmonar que habitualmente acompaña las neumonías por bacilos gram-negativos. Sin embargo, los modos de acción de estos antiinflamatorios sobre la regulación de los finos mecanismos inmunológicos durante las infecciones bacterianas, no han sido aún estudiados.

1.5. OBJETIVO DEL PRESENTE TRABAJO

Las infecciones por P. aeruginosa dejan graves secuelas respiratorias, debido a la importante destrucción de tejido pulmonar. La naturaleza de este fenómeno no está completamente dilucidada. Además de las quimiotactinas naturales del huésped, producidas por la interacción con sustancias bacterianas quimiotaxigénicas (LPS, por ejemplo), las quimiotactinas liberadas por el microorganismo contribuyen al aflujo de elevados números de

LPMN al sitio inflamatorio. Dado que estas células están asociadas a la producción de daño de tejido, las quimiotactinas bacterianas se convierten entonces en factores de patogénesis por ser importantes mediadoras del daño pulmonar producido por las células inflamatorias.

La exacerbación de los mecanismos inmunológicos inducidos por infecciones bacterianas puede conducir también a la injuria del tejido pulmonar. Las funciones regulatorias de las citocinas durante el daño tisular no han sido aún bien estudiadas. La IL-1 puede activar los mecanismos de daño a través de la modulación de los receptores de LPMN para péptidos quimiotácticos. El daño pulmonar, de esta forma inducido, podría inhibirse modulando las reacciones inflamatorias y restaurando el equilibrio inmunológico. Las DAINÉ podrían prevenir el daño tisular de pulmón, no sólo inhibiendo la producción de PGs, sino también a través de la modulación del efecto de la IL-1 sobre los LPMN en relación a las funciones de quimiotaxis y liberación de especies reactivas del oxígeno, activadas por las quimiotactinas de P. aeruginosa.

2.1. Cepas bacterianas y cultivos. Se utilizaron una cepa de P. aeruginosa inmunotipo 1 de Fisher-Devlin-Gnabasik y una cepa de E. coli Easter, gentilmente cedidas por la Dra. Anne Morris Hooke, Miami University, Ohio, USA. Las bacterias se cultivaron a 37°C rutinariamente en agar tripteína de soja (Difco, Detroit). Para preparar las suspensiones de nebulización, las bacterias fueron cultivadas durante una noche en caldo tripteína de soja en un incubador a aire con agitación rotativa a 200 rpm a 37°C. Los cultivos fueron lavados una vez por centrifugación a 12,000 g durante 10 minutos a 4°C. Los pellets fueron resuspendidos en solución salina a la densidad apropiada. Treinta mililitros de la suspensión bacteriana se colocaron en el nebulizador (85).

2.2. Ratones. Para los experimentos in vivo se utilizaron ratones no endocriados de la cepa Swiss de 4-6 semanas de edad. Los animales fueron obtenidos en el bioterio del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, donde fueron mantenidos durante los experimentos en condiciones estándar.

2.3. Drogas antiinflamatorias. Se utilizó un inhibidor de la ciclooxigenasa, piroxicam, obtenido del laboratorio Pfizer de Argentina. El antiinflamatorio fue disuelto en dimetilsulfóxido, diluido en NaHCO₃ 0.1 N. Posteriormente se realizaron diluciones

en ClNa 0.15 M para obtener las concentraciones adecuadas para los experimentos que se describen en Resultados.

Los complejos piroxicam-Cu²⁺ fueron formados mezclando volúmenes iguales de 2×10^{-4} M de piroxicam y 2×10^{-4} M de Cu²⁺ (CuSO₄), a fin de obtener una concentración final de 1×10^{-4} M.

2.4. Preparación y obtención de estimulantes de LPMN. El quinto componente del sistema complemento se obtuvo incubando 1 ml de suero humano fresco con 1 ml de una solución de polisacárido (300 mg/ml) de E. coli, serotipo 055:B5 (Sigma Chemical Co.;St.Louis Mo.) y 8 ml de HBSSw, durante 60 minutos a 37°C. Luego, se inactivó el suero por incubación a 56°C durante 30 minutos. El suero se diluyó al 5% por agregado de 10 ml de HBSS/c y se utilizó en los experimentos que se describen en Resultados como fuente de C5a (73).

El FMLP (Sigma Chemical Co.;St.Louis Mo.) fue disuelto en dimetilsulfóxido para obtener una concentración inicial de 10^{-2} M. Las diluciones utilizadas en los experimentos, se realizaron en HBSS/s para los ensayos de quimiotaxis y en HBSS/c para los demás ensayos. El FMLP alicuotado se conservó a -20°C, hasta el momento de su utilización (74).

Diez miligramos de zimosán (Sigma chemical Co.;St.Louis Mo.)

fueron suspendidos en 1 ml de HBSS/c, disgregados con varilla de vidrio, e incubados durante 30 minutos a 100°C. Posteriormente se realizaron 2 lavados, centrifugando a 12.000 g durante 10 minutos, cada vez. Luego de los lavados se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de suero humano fresco. La suspensión fue conservada a 4°C y utilizada dentro del día de su preparación (75).

La IL-1 beta recombinante humana de actividad específica aproximada de 1×10^8 U/mg fue obtenida de Genzyme, Boston, MA, USA. Las diluciones utilizadas en los experimentos fueron preparadas en PBS y mantenidas a -70°C.

2.5. Determinación de la actividad superóxido dismutasa de los complejos piroxicam-Cu²⁺. Se utilizó el método de reducción del ferricitocromo C a fin de evaluar la capacidad de los complejos piroxicam-Cu²⁺ de catalizar la dismutación del superóxido. El anión superóxido fue generado mediante la oxidación de xantina por la enzima xantina oxidasa en un medio apropiadamente tamponado, pH 9.8 (79). La inhibición de la reducción del ferricitocromo C catalizada por el anión superóxido fue evaluada espectrofotométricamente. Se determinó la disminución de la densidad óptica a 550nm.

2.6. Obtención de las quimiotactinas de *P. aeruginosa*. Se realizaron cultivos de *P. aeruginosa* en medio Vogel y Bonner en un incubador con agitación a 200 rpm y 37°C durante 8 horas. El cultivo fue centrifugado a 12,000 g durante 10 minutos y el pellet fue descartado. El sobrenadante fue esterilizado utilizando filtros de 0.2 μ m y las fracciones diferente peso molecular fueron separadas con filtros Centricon 30, 10, y 3 (Amicon Corp., Lexington, MA).

2.7. Tratamientos físicos, químicos y enzimáticos. La estabilidad a las altas temperaturas se determinó incubando 100 μ l del SBCP a 100°C durante 5 min. La estabilidad al álcali y al ácido se determinó incubando 50 μ l del SBCP con 150 μ l de NaOH 0.1N o 150 μ l de HCl 0.1 N durante 10 min. Posteriormente se ajustó el pH de las muestras a 7.4. Los tratamiento enzimáticos con pronasa (0.2 mg/ml), tripsina (0.01 mg/ml), carboxipeptidasa (0.1 U) (Sigma Chemical Co.; St. Louis Mo.), se realizaron incubando 150 μ l de cada enzima con 50 μ l del SBCP. La incubación con las distintas enzimas se realizó durante 30 min a 37°C e inmediatamente se efectuó una incubación a 100°C durante 5 min, para inactivar las enzimas. En todos los experimentos los controles fueron muestras a las que se le agregaron la enzima previamente incubada a 100°C por 5 min. La actividad de estos controles fueron consideradas el 100%. Para determinar la presencia de una fracción lipídica con capacidad quimiotáctica en el SBCP, se realizaron extraccio-

nes con cloroformo (2:1 vol/vol) luego de la acidificación a pH 1.6 con HCl 0.5 N y con cloroformo-metanol (2:1 vol/vol). Las muestra a las que se les realizaron los distintos tratamientos fueron evaluadas posteriormente en su capacidad quimiotáctica (111).

2.8. Preparación de la columna Dowex. Cincuenta gramos de resina Dowex 50x2 se resuspendieron en 5 volúmenes de H₂O destilada y se agitó durante 15 minutos, luego se dejó decantar para separar el material fino en suspensión. Este procedimiento se repitió 2 veces. La resina decantada se transfirió a un embudo Büchner con 2 litros de NaOH 2N, se llevó a pH neutral con H₂O destilada y luego se lavó con 4 litros de HCl 2N. Finalmente se transfirió la resina a la columna con 2 litros de buffer formato de amonio 0.2 M (pH:3.08), mediante presión de aire (100-150 Torr) (42). El procedimiento de desalado del SBCP se describe en detalle en los resultados.

2.9. Determinación de quimiotaxis in vitro. Se obtuvo sangre venosa de donantes voluntarios. Los LPMN fueron separados por sedimentación de la sangre en una solución de dextrán al 6% a 37°C, durante 60 min. La capa plasmática, rica en leucocitos, fue decantada y centrifugada. Las células obtenidas se lavaron con HBSS/s a 4°C. Los eritrocitos presentes en la suspensión fueron

lisados mediante shock hipotónico con 0.15 M de buffer NH_4Cl y 0.015 M de Tris-HCl, pH 7.25 por 30 min. (88). Finalmente la suspensión celular se ajustó a una densidad de 5×10^5 céls/ml. La actividad quimiotáctica de las muestras a analizar se efectuó utilizando una multi-micro-cámara de boyden con membrana de polivinil-pirrolidona (37). Las células atrapadas en la membrana luego de 60 minutos de incubación a 37°C en una atmósfera de aire con 5% de CO_2 y 99% de humedad, fueron teñidas con Diff-Quick. El número de células migradas se determinó mediante microscopía óptica con ocular milimetrado y los resultados se expresaron como el número de células por mm^2 .

2.10. Determinación de la producción de anión superóxido. Se determinó la reducción de ferricitocromo C mediante un método previamente descrito (76). Se colocaron en tubos eppendorf 0.8 ml de solución de HBSS/c y 8% de albúmina; 0.1 ml de ferricitocromo C; \pm 0.05 ml de SOD ; 0.1 ml del estímulo utilizado en los experimentos que se describen en Resultados. Luego se adicionó los LPMN en una densidad inicial de 10^7 céls/ml y se incubó por distintos tiempos a 37°C con agitación. Luego de cada tiempo de incubación se determinó la densidad óptica a 550 nm. Luego de la última lectura se redujo el ferricitocromo remanente adicionando 0.01 ml de ditionito de sodio a cada tubo y se determinó nuevamente la densidad óptica. El cálculo del anión superóxido producido se realizó mediante la siguiente fórmula: $\text{O.D.}/0.6 \times 100 =$

uM de anión superóxido = nmoles de anión superóxido producido/5 x 10⁵ LPMN/tiempo. Todos los reactivos utilizados para estas determinaciones se obtuvieron de Sigma Co. St. Louis, MO, USA.

2.11. Determinación de quimioluminiscencia. La generación de quimioluminiscencia se determinó por detección fluorométrica en presencia de luminol. Brevemente, 10 ul de luminol en una concentración inicial de 10⁻⁴ M se colocaron en viales de vidrio, posteriormente se agregaron a cada vial 10 ul del estímulo en la concentración correspondiente y 100 ul de LPMN en una densidad inicial de 10⁴ céls/ml. Las muestras se llevaron a un volumen final de 1 ml con HBSS/c y 10% de suero fetal bovino. Posteriormente se determinó la quimioluminiscencia por medición durante 20 min en un contador de centelleo líquido (78).

2.12. Determinación de H₂O₂. La producción de peróxido de hidrógeno por LPMN se determinó mediante la oxidación de rojo fenol por peroxidasa utilizando peróxido de hidrógeno como sustrato. Se colocaron en tubos Eppendorf 0.05 ml de LPMN, en una densidad inicial de 1 x 10⁷ céls/ml, 0.1 ml de una solución preparada a partir de 0.09 ml de rojo fenol, 0.07 ml de peroxidasa y 4.64 ml de HBSS/c con 4% de albúmina bovina. Finalmente se adicionó a cada tubo 0.05 ml del estímulo correspondiente. Los tubos fueron incubados a 37°C durante 45 minutos, la reacción se detuvo con

0.01 ml de NaOH 1N. Las muestras se centrifugaron en una microcentrífuga y los sobrenadantes se colocaron en una placa de 96 pocillos y se determinó la densidad óptica de cada muestra a 600 nm en un lector de placas de ELISA. La concentración de peróxido de hidrógeno se determinó a partir de una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de peróxido de hidrógeno (77). Todos los reactivos utilizados para estas determinaciones se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.13. Modelo animal de neumonía por P. aeruginosa. Los ratones fueron expuestos a un aerosol conteniendo P. aeruginosa. La exposición se llevó a cabo a temperatura ambiente, en una cámara especial construida sobre la base del diseño original descrito anteriormente (97). Los animales se expusieron al aerosol infectante durante 30 min y recibieron dosis de 1×10^5 a 8×10^5 UFC/ml. La granulocitopenia se indujo inoculando a los ratones con una dosis i.p. de 200 mg/Kg (CP Sigma, St. Louis). Los animales fueron inoculados nuevamente a las 96 horas, con una dosis de 200 mg/Kg y desafiados por aerosol con la bacteria. Cuando fue necesario, se le administró a los ratones una tercera dosis de ciclofosfamida, cuatro días después del desafío, a fin de asegurar la granulocitopenia por un período mayor a una semana.

2.14. Inducción de la quimiotaxis de LPMN. La inducción de mi-

gración de LPMN hacia el pulmón se realizó por exposición de los ratones a un aerosol, según se describió previamente. Los aerosoles contenían según los experimentos: 30 ml de una suspensión de P. aeruginosa, 5 ml de FMLP de una concentración 10^{-3} M o 5 ml del SBCP de una concentración 10x con respecto al SBCP original.

2.15. Lavados pulmonares en ratones. Los animales fueron sacrificados mediante inyección intraperitoneal de una sobredosis de pentobarbital sódico. Inmediatamente después se les practicó una incisión longitudinal vertical, se abrió la cavidad torácica y se aisló la tráquea. Mediante un catéter de polipropileno se canuló la tráquea asegurándose el mismo con un nudo de sutura. El extremo libre de la cánula se conectó, mediante tubuladura plástica, a una llave de 3 vías. En la segunda terminal de la llave se ajustó una jeringa plástica de 5 ml, conteniendo solución fisiológica a una temperatura de 37°C . La tercera terminal de la llave fue conectada, mediante tubuladura fina, a un tubo de polipropileno comunicado con una bomba manual de vacío. De esta forma, se inyectaron volúmenes de solución fisiológica previamente calculado para cada animal, manteniendo cerrada la vía de comunicación con el tubo. Estos volúmenes fueron calculados como el equivalente al 3% del peso corporal (98). Luego de 10 segundos se cerró la vía que comunica con la jeringa, produciendo al mismo tiempo vacío en el tubo, mediante la bomba manual. Así, el líquido de lavado fluyó desde los pulmones al tubo. Esta operación

se repitió un total de 6 veces por animal. Los líquidos de lavado fueron mantenidos en baño de hielo hasta su análisis citológico.

2.16. Citología de los líquidos de lavado pulmonar. La viabilidad celular fue analizada por el test combinado del azul de tripan y del rojo neutro (31). El recuento total de células se realizó utilizando una cámara de Neubauer. Los recuentos diferenciales se llevarán a cabo sobre extendidos preparados por sedimentación de los líquidos de lavado, fijados apropiadamente y teñidos con Giemsa. Las actividades de oxidasa y estearasa fueron determinadas por análisis histoquímicos standard (116). Los resultados fueron expresados como el número total de LPMN o células mononucleares recolectadas en los líquidos de lavado.

2.17. Depuración pulmonar de P. aeruginosa. Los ratones tratados con antiinflamatorio y los ratones controles fueron expuestos al aerosol conteniendo la bacteria. Seis ratones fueron sacrificados inmediatamente luego del desafío para determinar el número de UFC depositadas en los pulmones, otro grupo de 6 ratones fue sacrificado a las 4 horas posteriores al desafío. Los pulmones fueron removidos y homogenizados en 5 ml de agua destilada. Los homogenatos fueron sembrados en placas de agar tripteína de soja. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de UFC rema-

nentes en los pulmones 4 horas luego del desafío (118).

2.18. Determinación de mieloperoxidasa en homogenatos de pulmón.

Se determinó espectrofotométricamente la concentración de MPO en los sobrenadantes de homogenatos de pulmón de ratones aerosolizados con las quimiotactinas bacterianas y/o tratados con piroxicam, según la metodología descrita previamente. Los animales fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital sódico y se realizó la perfusión del pulmón a fin de extraer la hemoglobina que interfiere con la determinación de MPO. Los pulmones fueron colocados en 1 ml de PBS, homogeneizados y sonicados a 70W, 2 veces por 15 segundos cada vez. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 3000 RPM por 10 min. En 20 μ l de los sobrenadantes obtenidos se realizó la determinación espectrofotométrica de la concentración MPO. La mezcla de reacción contenía 400 μ l de PBS, 80 μ l de dimetil formamida, 20 μ l de H_2O_2 , 400 μ l de buffer fosfato (200 mM) y 80 μ l de 3,3',5,5'tetrametil-benzidina como sustrato. El incremento de la densidad óptica para cada muestra se registró durante 5 minutos a 655nm. Se definió una unidad de MPO, como la cantidad de enzima que dio un cambio de densidad óptica de 0.1/min (6).

2.19. Determinación de proteínas solubles en líquidos de lavado pulmonar. Se realizó la determinación de las proteínas conteni-

das en los líquidos de lavado pulmonar, obtenidos según se detalla en un ítem anterior. Los ratones pretratados durante 5 días con una dosis de 0.64 mg/ml de piroxicam fueron nebulizados con el SBCP 10x, según se describe previamente. Se determinó para cada muestra la concentración de proteínas por el método de Lowry (71).

2.20. Estudios histopatológicos. Los ratones tratados con piroxicam y los ratones controles fueron sacrificados a diferentes tiempos luego de la exposición al aerosol de P. aeruginosa. Los pulmones fueron removidos y llenados, a presión atmosférica, con formalina bufferada 10%. Posteriormente los pulmones fueron sumergidos en formalina bufferada 10%. Los cortes histológicos fueron preparados por los métodos convencionales y teñidos con hematoxilina y eosina. Se tomaron fotomicrografías de los cortes y fueron contados al menos 10 secciones de vasos y 10 secciones de pulmón de grupos de 6 ratones. Las áreas de infiltración alrededor de los vasos y del tejido pulmonar y las áreas de las secciones internas de los vasos y del tejido pulmonar calcados en papel fueron cuidadosamente recortados y pesados individualmente. Los pesos del área infiltrada (W_i) y de la sección interna del vaso o del bronquio (W_s) fueron determinados, las relaciones W_i/W_s , y los resultados se expresaron como el índice de la infiltración peribronquial ($IPB = [W_i/W_s] \times 100$) o el índice de infiltración perivascular ($IPV = [W_i/W_s] \times 100$). Estas expresiones

cuantitativas representan valores reproducibles proporcionales al grado de infiltración peribronquial y perivascular, respectivamente.

2.21. Consideraciones estadísticas. En todos los casos, sobre la base de estimaciones previas de la dispersión de los datos, se determinó el tamaño de muestra para cada uno de los experimentos utilizando el programa SAMPLSZ del paquete estadístico EPISTAT (Tracy L. Gustafson, MD, Round Rock, Texas, USA). Las comparaciones estadísticas de muestras que no tenían distribución normal se llevaron a cabo por medio del contraste de la suma de rangos usando el programa RANKTEST. Las comparaciones de muestras con distribución normal se hicieron utilizando el test de Student, del mismo paquete estadístico. El procesamiento de los datos se realizó con los programas descritos en una computadora IBM.

Resultados

3.1. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD QUIMIOTACTICA BACTERIANA.

3.1.1. Métodos de determinación de la quimiotaxis.

Distintos métodos para el estudio de la quimiotaxis de LPMN han sido desarrollados en las últimas décadas. El método de la multi-micro-cámara de Boyden es el más frecuentemente utilizado, cuando es necesaria la evaluación de un gran número de muestras. Cuando se carece de equipos que permitan el análisis de superficie por microscopía, el procedimiento habitual para determinar el número de células retenidas en el filtro es la observación por microscopía óptica. Mediante esta metodología, se determinó la concentración óptima de FMLP (10^{-7} M), posteriormente utilizada en todos los experimentos (figura 1). Sin embargo, este procedimiento resultó extremadamente tedioso para el gran número de muestras que se debían analizar en este trabajo. Esta consideración creo la necesidad de desarrollar una nueva metodología para la evaluación de los resultados de los ensayos de quimiotaxis.

Recientemente se describió un método espectrofotométrico, usando una cámara de Boyden convencional, para la evaluación de la quimiotaxis, basado en la extracción del colorante con que se tiñen las células retenidas en el filtro (34). A pesar de que el método resultó exitoso para evaluar la migración de una gran variedad de células, no fue posible distinguir la quimiotaxis de LPMN de su migración aleatoria. Por consiguiente, fue necesario el desarrollo de un micrométodo que permitiera el estudio de la

migración de LPMN. En base al método previamente descrito, se modificó el procedimiento de extracción del colorante, realizán-

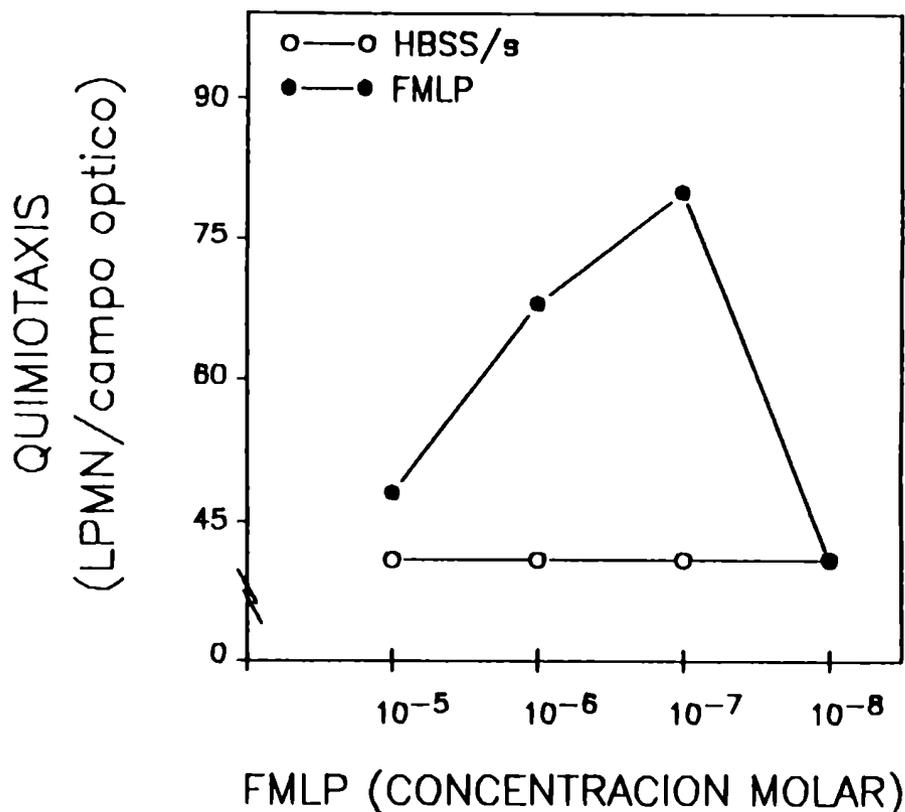


Figura 1. Quimiotaxis los LPMN hacia distintas concentraciones de FMLP. Cada punto representa la media aritmética del número de LPMN de 8 campos ópticos, en un experimento representativo.

dolo en dos pasos, lo cual aumento significativamente la sensibilidad de la posterior determinación espectrofotométrica. Los ensayos de quimiotaxis se realizaron según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. Las áreas del filtro correspondientes a triplicados de cada preparación quimiotáctica fueron recortadas y colocadas en tubos de ensayo y disueltas en 100 ul

de cloroformo. Posteriormente, se extrajo el colorante con 200 ul de HCl 1N y se evaporó el cloroformo en baño de agua a 80°C. Cien microlitros de cada muestra fueron transferidos a una placa de 96 pocillos y se determinó la densidad óptica 600 nm, utilizando un lector de placas de ELISA.

Finalmente se comparó el procedimiento de recuento de células por microscopía óptica con el método desarrollado (figura 2).

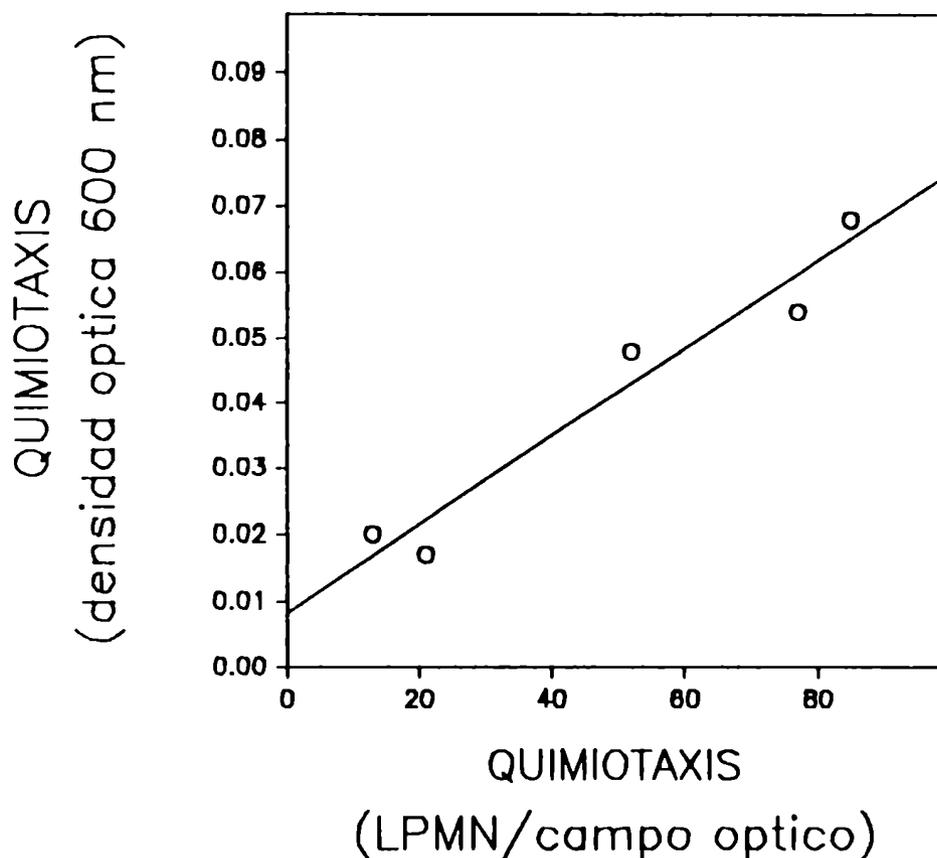


Figura 2. Correlación entre la densidad óptica a 600nm (método de extracción en dos pasos con cloroformo y ácido clorhídrico) y el número de LPMN de 12 campos ópticos evaluados para cada muestra (método óptico). La regresión lineal fue significativa $p=0.00674$, $r=0.968$.

Un grupo de triplicados de cada muestra fue evaluado microscópicamente y un segundo grupo se evaluó por el método espectrofotométrico. Se determinó el número total de células en cuatro campos ópticos representativos de cada triplicado, y los resultados fueron expresados como la media aritmética de doce campos ópticos de la concentración de FMLP investigada. Los resultados obtenidos mediante la extracción en dos pasos se correlacionaron con los obtenidos por recuento de células por microscopía óptica.

La densidad óptima de LPMN utilizada en los ensayos de quimiotaxis fue 10^7 células por ml. El método resultó de bajo sensibilidad para densidades menores de células. Densidades mayores que 10^7 LPMN/ ml propiciaron resultados de baja reproducibilidad debido a agregación de los LPMN. La extracción total del colorante por el HCl 1N, luego de la evaporación del cloroformo incrementó notablemente la sensibilidad del método (figura 3). El tratamiento directo del filtro con HCl 1N, sin tratamiento previo con cloroformo, extrajo el colorante sólo parcialmente, por lo que la sensibilidad del ensayo fue significativamente menor. Por consiguiente la extracción en dos etapas resultó más sensible que la extracción con HCl 1N únicamente. Esta metodología fue empleada en todos los experimentos de quimiotaxis que se detallan en esta investigación.

3.1.2. Conclusiones parciales.

Se desarrolló un método de extracción en dos pasos, que per-

mitió estudiar la respuesta quimiotáctica de LPMN usando una multi-micro-cámara de Boyden. La combinación del micrométodo de

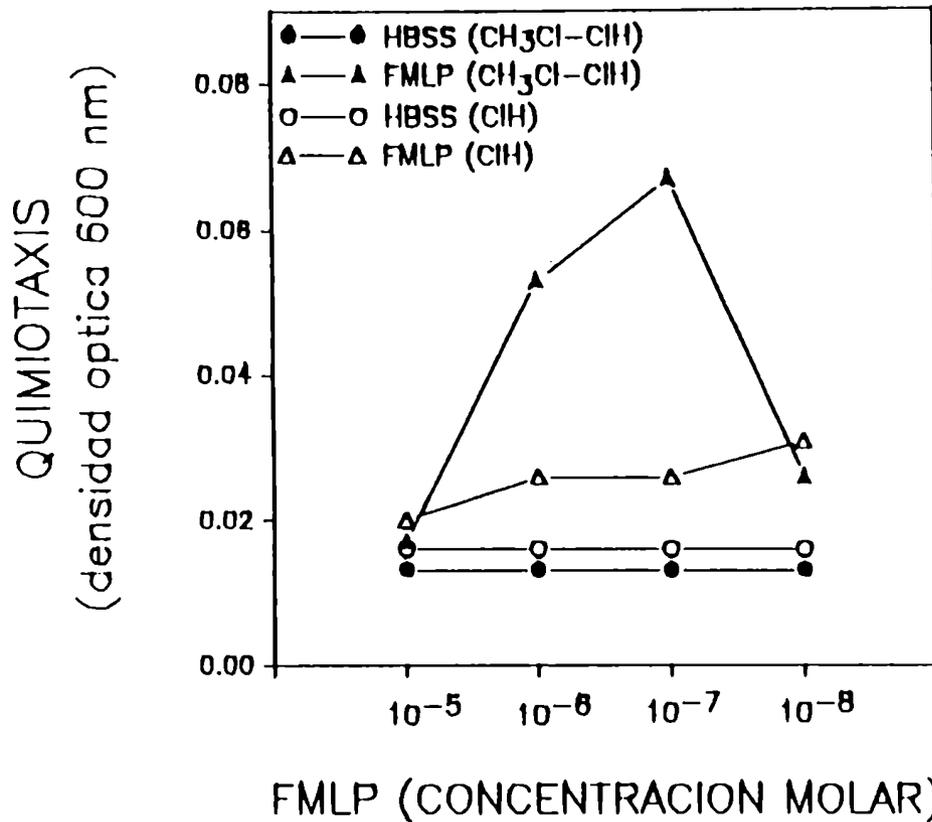


Figura 3. Comparación de la magnitud de la migración celular hacia FMLP mediante la extracción por HCl 1N solamente o por la extracción con Cl_3CH y HCl 1N. Cada punto representa la densidad óptica del colorante extraído de las tres áreas del filtro correspondientes a cada muestra evaluada, de un experimento representativo. El experimento fue repetido 8 veces.

Boyden y la técnica de extracción del colorante permite la evaluación de numerosas muestras con alta sensibilidad, sin la necesidad de utilizar costosos equipamientos.

3.2. CARACTERIZACION, FUNCION BIOLOGICA IN VITRO Y COMPOSICION

DEL SOBRENADANTE DE CULTIVO DE *P. aeruginosa* (SBCP).

3.2.1. Características físicas y químicas del SBCP.

La actividad quimiotáctica fue termoresistente y permaneció inalterable luego de la hidrólisis básica o ácida, en un rango de pH desde 4 a 10 (figura 4). Luego de la extracción con cloroformo,

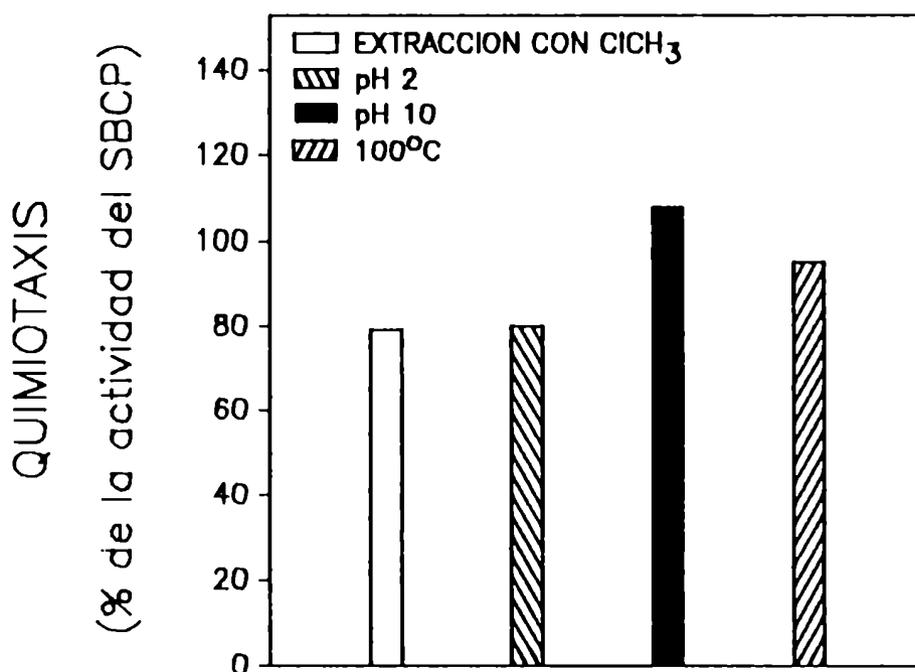


Figura 4. Actividad quimiotáctica del SBCP luego de los tratamientos que se indican. Cada barra representa la densidad óptica del colorante extraído de las tres áreas del filtro correspondientes a cada muestra evaluada, en un experimento representativo. El experimento fue repetido 8 veces.

mo, el SBCP conservó el 80% de su actividad original. El extrac-

to clorofórmico reconstituido al volumen original con medio-fresco retuvo una actividad quimiotáctica equivalente al 2% de la actividad del SBCP 1:1. La actividad quimiotáctica no fue afectada por la digestión con tripsina o carboxipeptidasa, pero disminuyó en un 73% luego de la incubación con pronasa (figura 5).

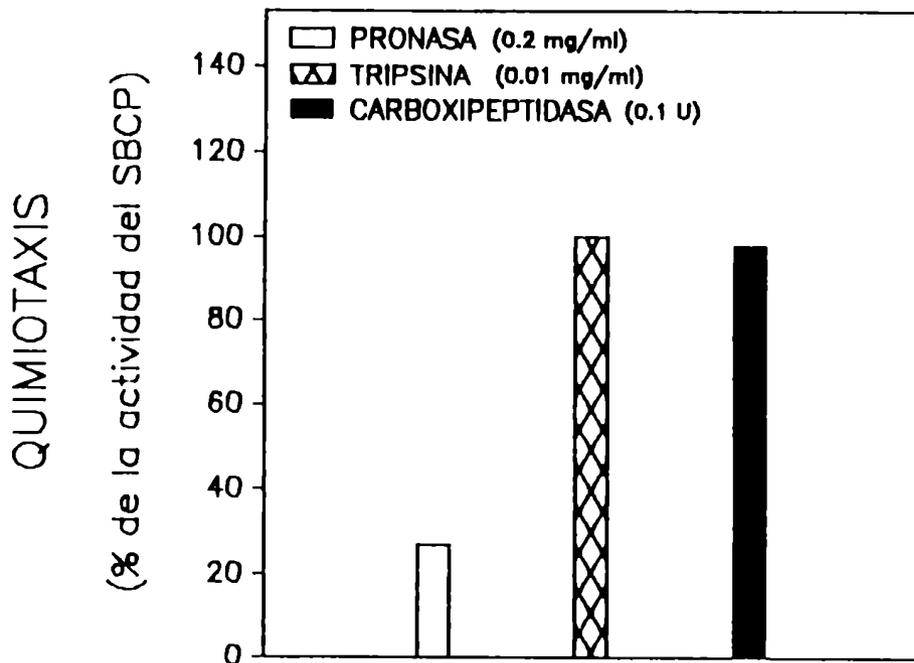


Figura 5. Actividad quimiotáctica del SBCP luego de los tratamientos enzimático que se indican. Cada barra representa la densidad óptica del colorante extraído de las tres áreas del filtro correspondientes a cada muestra evaluada, en un experimento representativo. El experimento fue repetido 8 veces.

El fraccionamiento del sobrenadante de cultivo por peso molecular a través de filtros Centricon 30, Centricon 10 y Centricon 3

mostró que la fracción de componentes de peso molecular menor de 3 kD tenía la mayor actividad quimiotáctica (figura 6).

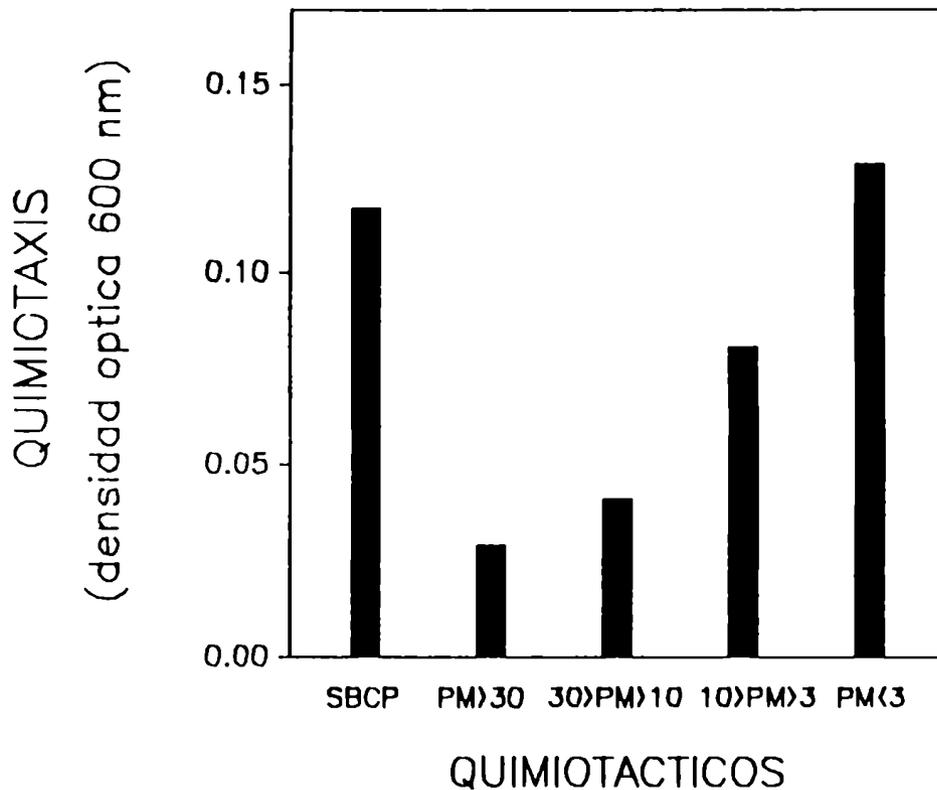


Figura 6. Actividad quimiotáctica de fracciones de distinto peso molecular del SBCP, obtenidas por ultrafiltración. Cada barra representa la densidad óptica del colorante extraído de las tres áreas del filtro correspondientes a cada muestra evaluada, en un experimento representativo. El experimento fue repetido 8 veces.

Esta primera caracterización evidenció que la actividad quimiotáctica del sobrenadante estaba relacionada con componentes de características peptídicas y que la mayor actividad quimiotáctica correspondía a sustancias de bajo peso molecular y que esta actividad es estable a cambios de pH y a altas temperaturas.

3.2.2. Función biológica in vitro del SBCP.

En la siguiente etapa del trabajo se evaluó comparativamente la quimiotaxis de LPMN hacia FMLP, C5a, SBCP y el SBCE (sobrenadante de cultivo de *E. coli*) (figura 7).

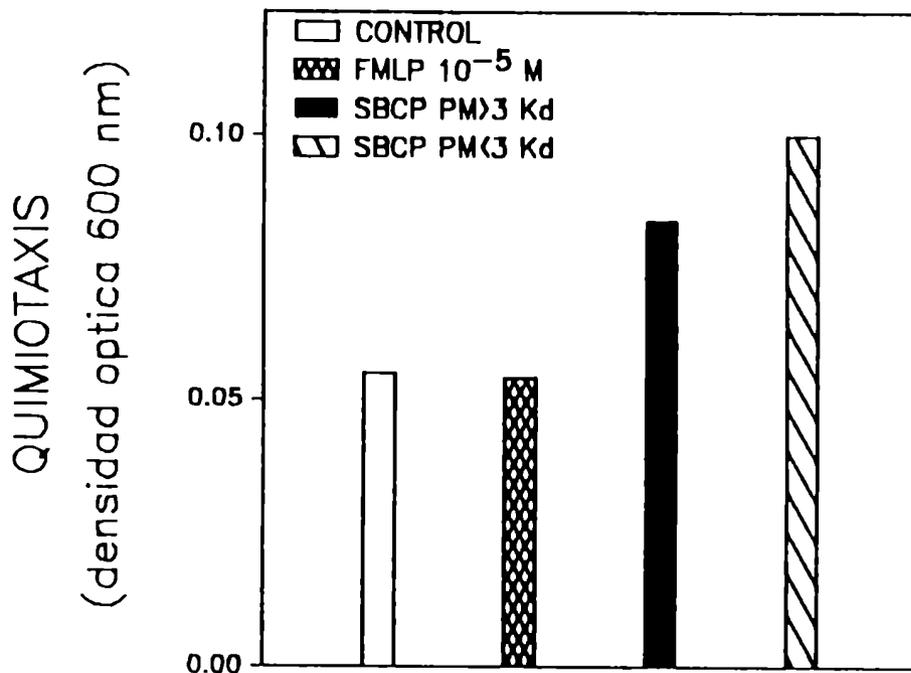


Figura 7. Actividad quimiotáctica de C5a, SBCE, SBCP y FMLP 10^{-7} . Cada barra representa la densidad óptica del colorante extraído de las tres áreas del filtro correspondientes a cada muestra evaluada, en un experimento representativo. El experimento fue repetido 8 veces.

El SBCP 1X exhibió actividad quimiotáctica de una magnitud similar a la observada para el SBCE 1X.

A fin de determinar si los receptores de LPMN para el SBCP

eran los mismos sobre los que actúa el FMLP se realizaron los experimentos que se describen a continuación. La preincubación de los LPMN durante 5 min con FMLP indujo una disminución dosis-dependiente en la actividad quimiotáctica de los LPMN hacia el SBCP o hacia FMLP 10^{-7} M (figura 8).

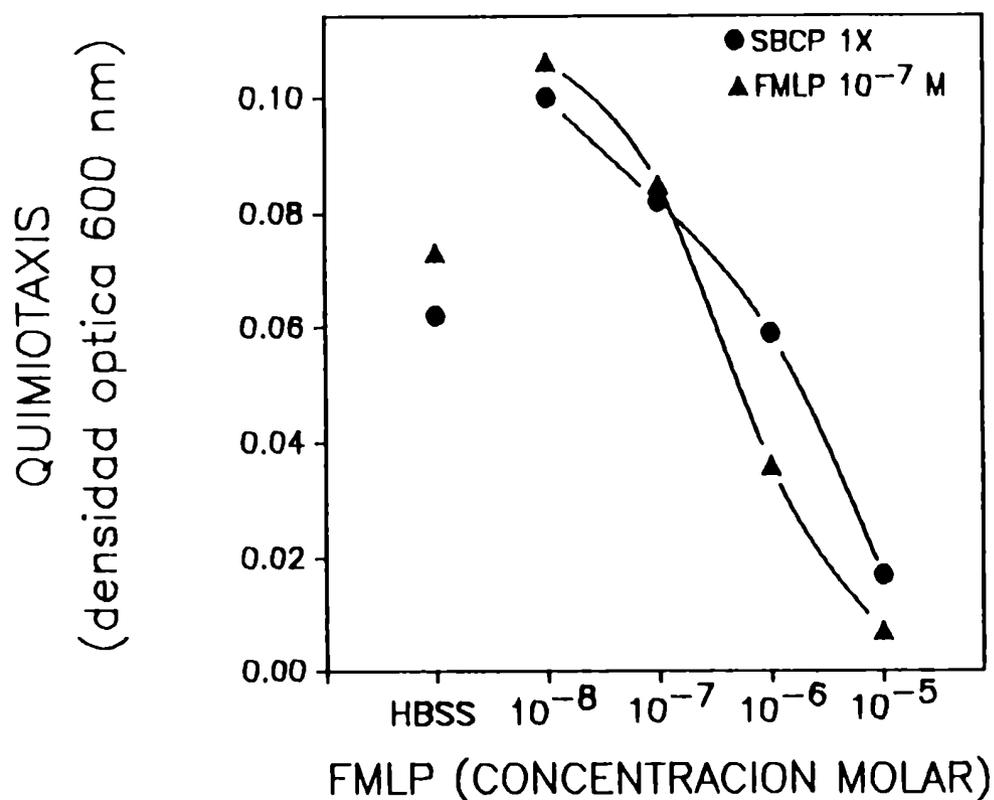


Figura 8. Quimiotaxis de LPMN hacia el SBCP y FMLP 10^{-7} . Efecto de la preincubación de los LPMN con distintas concentraciones de FMLP. Cada barra representa la densidad óptica del colorante extraído de las tres áreas del filtro correspondientes a cada muestra evaluada, en un experimento representativo. El experimento fue repetido 8 veces.

La preincubación por períodos más prolongados que 5 min condujo a la agregación de los LPMN. La actividad quimiotáctica fue total-

mente inhibida cuando los LPMN fueron preincubados con FMLP 10^{-5} M. La quimiotaxis de LPMN hacia C5a no fue afectada por la preincubación de las células con FMLP 10^{-5} M o por preincubación de las células con las fracciones de PM>3 kD y PM<3 kD del SBCP (figura 9).

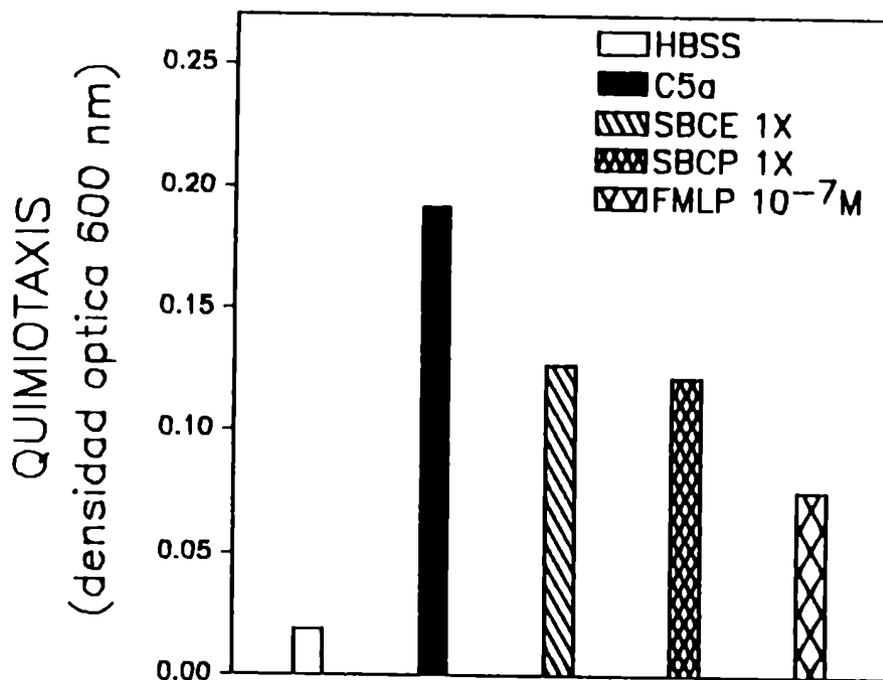


Figura 9. Quimiotaxis de LPMN hacia C5a. Efecto de la preincubación de los LPMN con FMLP 10^{-5} y las fracciones de PM>3 kD y PM<3 kD del SBCP. Cada barra representa la densidad óptica del colorante extraído de las tres áreas del filtro correspondientes a cada muestra evaluada, en un experimento representativo. El experimento fue repetido 8 veces.

En otra serie de experimentos, se evaluó el efecto de la preincubación de LPMN con las fracciones de PM>3 kD y PM<3 kD del SBCP

sobre la quimiotaxis de las células frente a distintas concentraciones de FMLP. Los resultados se describen en la figura 10.

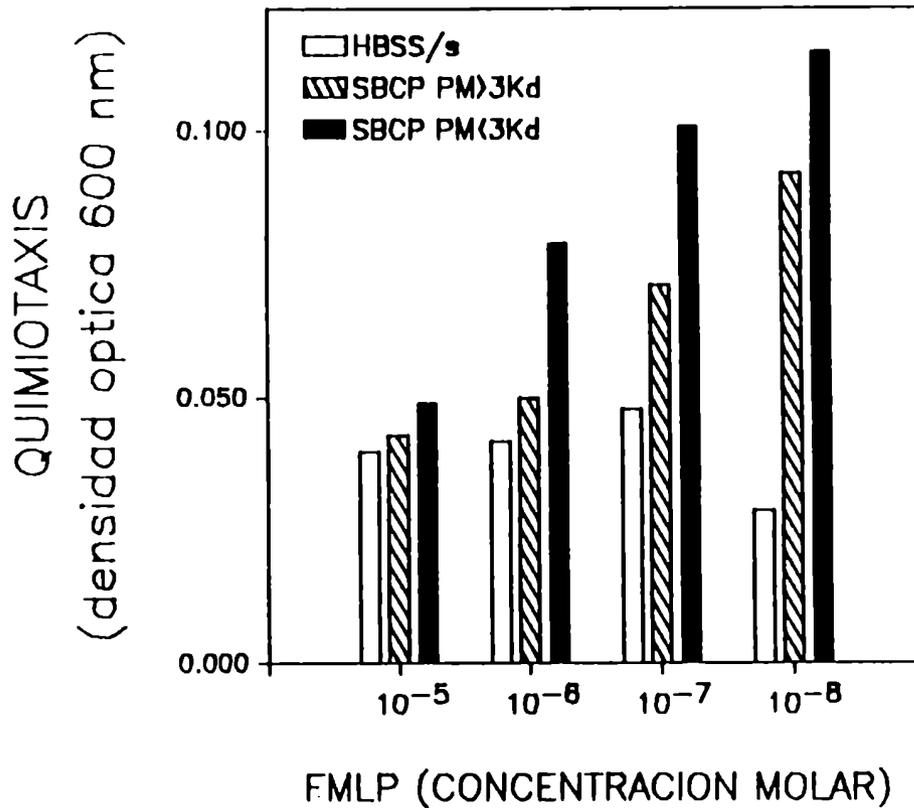


Figura 10. Quimiotaxis de LPMN hacia distintas concentraciones de FMLP. Efecto de la preincubación de los LPMN con las fracciones de PM > 3 kD y PM < 3 kD del SBCP. Cada barra representa la densidad óptica del colorante extraído de las tres áreas del filtro correspondientes a cada muestra evaluada, en un experimento representativo. El experimento fue repetido 8 veces.

Las fracciones del SBCP ejercieron un efecto preactivador sobre la quimiotaxis de las células, este resultado coincidió con los obtenidos cuando se preincubaron los LPMN con FMLP en una concentración de 10⁻⁸ M (figura 9). La evaluación de la quimiotaxis de

LPMN hacia las fracciones de PM>3 kD y PM<3 kD del SBCP, no fue afectada por preincubación de las células con C5a. El SBCP liofilizado fue reconstituido a una concentración 10X con HBSS/s. La máxima actividad quimiotáctica fue observada a la dilución 1:32 del sobrenadante de cultivo 10X con HBSS/s, la máxima actividad quimiotáctica de FMLP fue obtenida a una concentración molar de 10^{-7} (figura 11). Ambas curvas dosis-respuesta exhibieron un patrón de respuesta con una disminución de la actividad quimiotáctica a altas concentraciones.

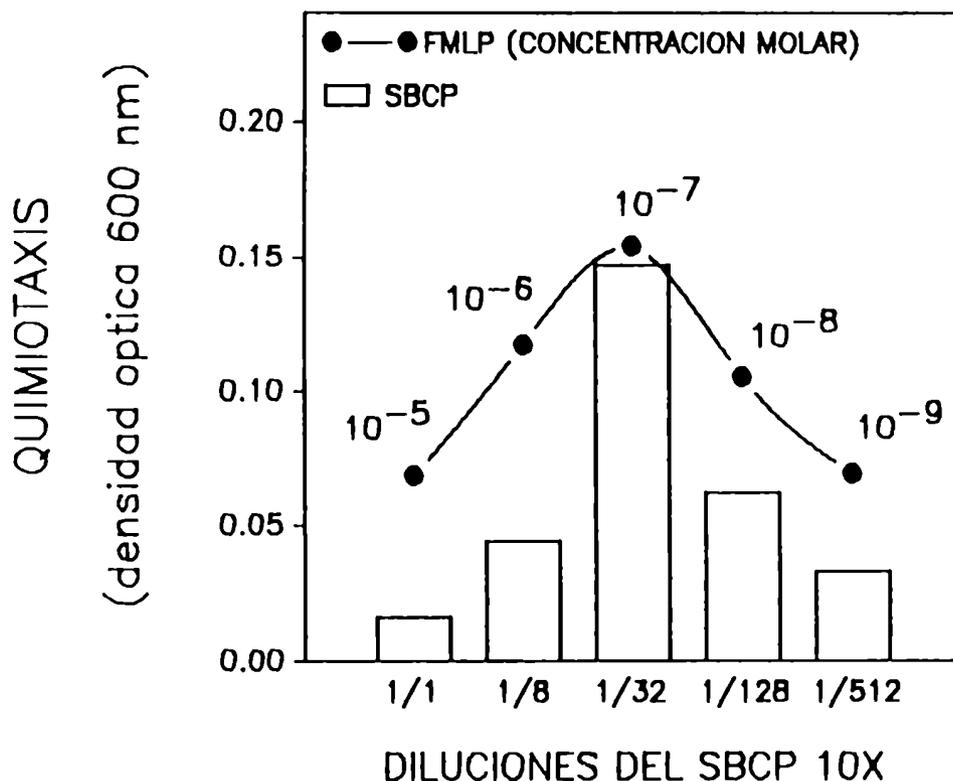


Figura 11. Quimiotaxis de LPMN hacia distintas concentraciones de FMLP y distintas diluciones del SBCP 10X. Cada barra representa la densidad óptica del colorante extraído de las tres áreas del filtro correspondientes a cada muestra evaluada, en un experimento representativo. El experimento fue repetido 8 veces.

3.2.3. Separación y purificación de los péptidos quimiotácticos.

Un inóculo tomado de una placa de 24 horas de cultivo en medio tripteína de soya sólido, se resuspendió en 1 litro de medio mínimo Vogel-Bonner y se cultivó durante 8 horas a 37°C con agitación. El cultivo fue centrifugado a 3000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante recolectado fue esterilizado utilizando un filtro de poro de 0.2 μ m y liofilizado. El residuo obtenido se extrajo 5 veces con 500 ml de N-butanol-ácido acético glacial (10:1, v/v). El sobrenadante se evaporó en rotapavor a 45°C en vacío. El residuo fue disuelto en 10 ml de H₂O destilada, se llevó a pH 3 con HCl 6N y se aplicó a una columna Dowex 50x2 (20x2 cm) a fin de desalar los péptidos quimiotácticos.

El sobrenadante de cultivo liofilizado se sembró en la columna y el intercambio iónico se llevó a cabo con 100 ml de buffer formiato de amonio 0.2 M, para retener los péptidos relativamente ácidos, y 400 ml de buffer acetato de amonio 0.2 M a pH:5 para los demás péptidos. Se eluyeron 500 ml de buffer por la columna, recolentándolos en fracciones de 15 ml a una velocidad de 120 ml por hora. Alícuotas de cada fracción fueron evaluadas en su contenido peptídico mediante una reacción de ninhidrina. La elusión de los péptidos se realizó a la misma velocidad con 300 ml de buffer acetato de amonio 2 M (pH:7) con el agregado de 10 ml de piridina 0.5 M para extraer los péptidos con residuos hidrofóbicos. La piridina de esta última fracción fue eliminada por evaporación y el eluato posteriormente liofilizado. El resi-

duo obtenido de la columna fue analizado mediante una cromatografía en capa delgada (TLC) (122). La muestra se disolvió en el solvente de corrida, N-butanol-ác. acético-H₂O (10:1:3, v/v/v), y parte de la misma fue filtrada utilizando un Centricon 3, para obtener la fracción de PM<3 kD. Las muestras fueron sembradas en una placa de sílica gel G y como control se sembró una alícuota de FMLP. El cromatograma se corrió durante 6 horas. La presencia de péptidos fue revelada con ninhidrina y el esquema de la cromatografía obtenida se muestra en la figura 12.

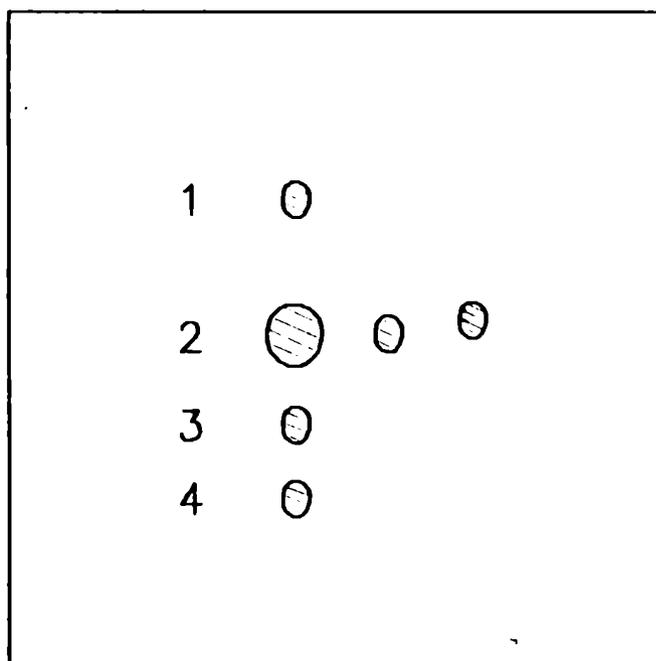


Figura 12. Diagrama de la cromatografía en capa delgada del SBCP (calle izquierda), La fracción de PM<3 kD obtenida por ultrafiltración (calle central) y FMLP (calle derecha). Los áreas rayadas indican reactividad a la ninhidrina.

De las cuatro fracciones obtenidas, la número 2 demostró tener un coeficiente de partición similar a la fracción de PM<3 kD y al FMLP, en el solvente utilizado. De una placa duplicada cromatografiada simultáneamente con la placa revelada se eluyeron las zonas reactivas a la ninhidrina y los sobrenadantes obtenidos del lavado de la sílica con buffer fosfato fueron evaluados en su capacidad quimiotáctica. Los resultados de la figura 13, demues-

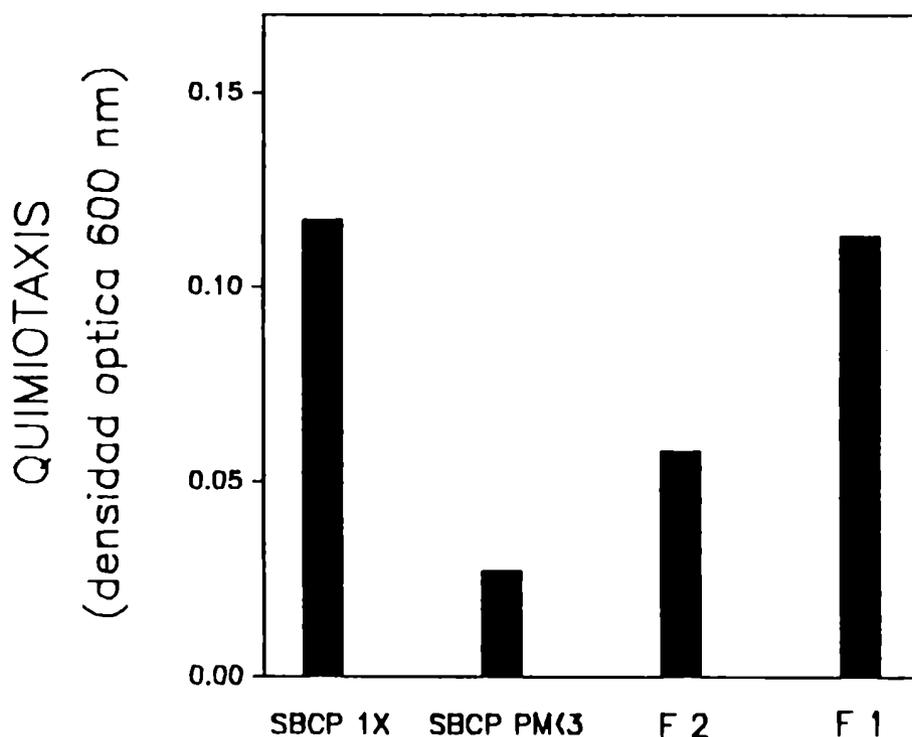


Figura 13. Quimiotaxis de LPMN hacia FMLP 10^{-7} M, SBCP 1X o las distintas fracciones del SBCP obtenidas por TLC. Cada barra representa la densidad óptica del colorante extraído de las tres áreas del filtro correspondientes a cada muestra evaluada.

tran que sólo las fracciones 1 y 2 obtenidas mediante la cromatografía, contenían actividad quimiotáctica.

3.2.4. Conclusiones parciales.

Esta serie de experimentos evidenciaron que los componentes del SBCP actúan sobre el mismo receptor que el FMLP y que su actividad quimiotáctica no involucra el receptor de C5a. La cinética de actividad quimiotáctica del SBCP 10X en relación a la concentración fue semejante a la observada para FMLP. Ha sido bien estudiado que bajas concentraciones del quimiotáctico sintético, involucran receptores de alta afinidad, relacionados con la quimiotaxis, mientras que altas concentraciones involucran receptores de baja afinidad y se relacionan con las funciones del estallido respiratorio, pero que no inducen la migración de las células. Trabajos previos con E. coli han demostrado que esta bacteria produce, en condiciones óptimas de crecimiento in vitro, no más que 10^{-9} M de FMLP (26). Estos resultados permiten considerar la posibilidad de que el SBCP contenga una concentración de péptidos quimiotácticos similar a la estimada para E. coli.

Los resultados obtenidos permitieron deducir también que, el SBCP contiene dos fracciones con actividad quimiotáctica, que uno de ellos corresponde a una o varias especies peptídicas de bajo peso molecular y se aisló como FMLP. Acerca de la primer fracción con actividad quimiotáctica, solo se puede deducir que es de naturaleza peptídica por su reactividad frente a la ninhidrina

pero de composición desconocida.

3.3. SBCP: MODIFICACION DE SU ACTIVIDAD QUIMIOTACTICA IN VITRO POR IL-1 Y DAINE

3.3.1. Efecto promotor de la IL-1 sobre la quimiotaxis de LPMN.

Con el fin de estudiar la modulación de la respuesta de LPMN hacia el SBCP, las células fueron incubados en distintas condiciones con IL-1 para luego evaluar la respuesta migratoria hacia las quimiotactinas bacterianas. Las células se resuspendieron en HBSS/s ajustando la densidad a 2×10^7 céls/ml. El efecto promotor fue investigado incubando 1×10^6 LPMN con 10 a 100 unidades de IL-1 en un volumen total de 140 ul. El tiempo de incubación varió entre 30 y 60 minutos, a 37°C con agitación, y el tiempo óptimo de incubación determinado fueron 30 minutos. Luego de la incubación, se adicionaron a los tubos 860 ul de HBSS/s. Los LPMN utilizados como control en cada ensayo fueron incubados con HBSS/s bajo las mismas condiciones. La actividad quimiotáctica de los LPMN estimulados con IL-1 fue evaluada frente a FMLP y las fracciones de $\text{PM} > 3 \text{ kD}$ y $\text{PM} < 3 \text{ kD}$ del SBCP. En experimentos preliminares de quimiotaxis se pudo demostrar que la concentración óptima de FMLP era 10^{-7} M para ensayos donde se utilizaron 10^7 LPMN/ml no pretratados. Los ensayos de quimiotaxis para determinar el efecto promotor de la IL-1 se llevaron a cabo con 10^6 LPMN/ml y la concentración óptima de FMLP fue 10^{-8} M.

En la figura 14 se observa el efecto promotor de la IL-1 sobre la quimiotaxis de LPMN hacia a FMLP. La máxima actividad promotora se observó cuando 10^6 LPMN fueron tratados con 20 U IL

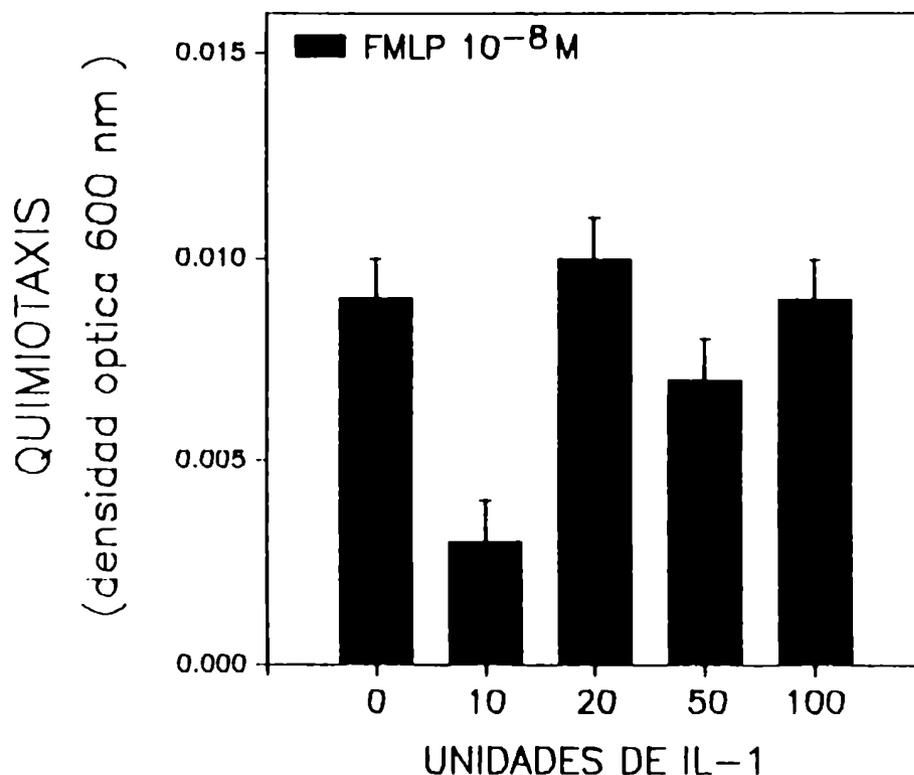


Figura 14. Efecto pre-estimulante de distintas dosis de IL-1 sobre LPMN. Se describe la quimiotaxis de los LPMN frente a FMLP 10^{-8} M. Cada barra representa la media aritmética \pm ES de la densidad óptica del colorante extraído de las tres áreas del filtro correspondientes a cada muestra evaluada.

1. Las figuras 15 y 16 muestran que el máximo efecto promotor sobre LPMN fue inducido por incubación de los LPMN con 20 U de IL-1 en ensayos de quimiotaxis utilizando las fracciones de $PM > 3$ kD y $PM < 3$ kD del SBCP como agente quimiotáctico, respectivamente.

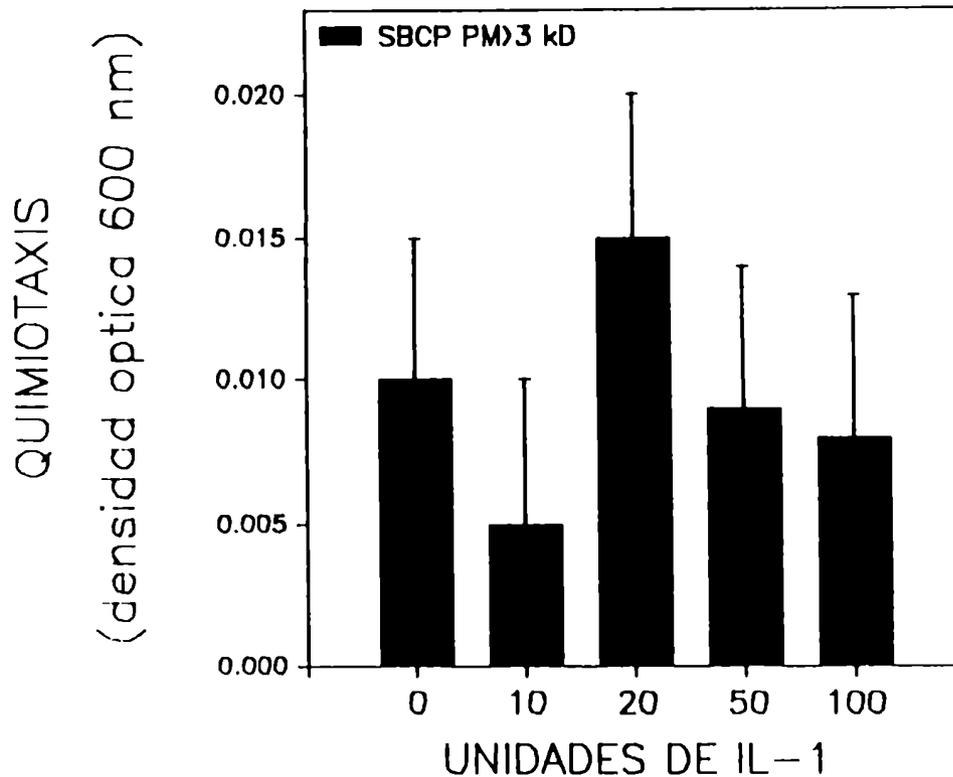


Figura 15. Efecto pre-estimulante de distintas dosis de IL-1 sobre LPMN. Se describe la quimiotaxis de los LPMN frente a la fracción de PM>3 kD del SBCP. Cada barra representa la media aritmética de la densidad óptica del colorante extraído de las tres áreas del filtro correspondientes a cada muestra evaluada.

3.3.2. Efecto de DAINE sobre la quimiotaxis de LPMN.

La preincubación de los LPMN con 10 o 100 ug/ml de piroxicam y el posterior lavado de las células con HBSS/s, no inhibió la respuesta quimiotáctica inducida por el SBCP o por las fracciones de diferente peso molecular obtenidas por ultrafiltración.

La respuesta quimiotáctica fue sin embargo significativamente inhibida cuando los LPMN fueron resuspendidos en HBSS/s que

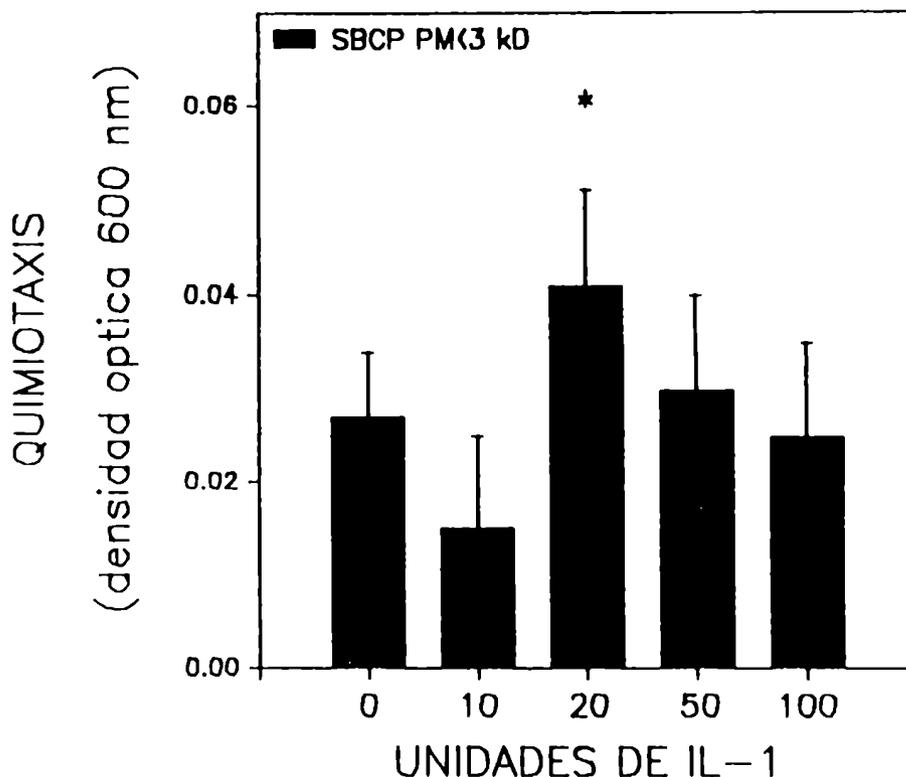


Figura 16. Efecto pre-estimulante de distintas dosis de IL-1 sobre LPMN. Se describe la quimiotaxis de los LPMN frente a la fracción de PM<3 kD del SBCP. Cada barra representa la media aritmética de la densidad óptica del colorante extraído de las tres áreas del filtro correspondientes a cada muestra evaluada, * $P < 0.05$ para los LPMN pre-estimulados con 20 U de IL-1.

contenían 100 ug/ml de piroxicam, durante el ensayo de quimiotaxis (figura 17). Las concentraciones del antiinflamatorio menores a 100 ug/ml no inhibieron la migración de los LPMN hacia FMLP o hacia las quimiotactinas bacterianas. Estos resultados indicaron que el piroxicam tiene capacidad de inhibir la respuesta quimiotáctica, por acción directa sobre los LPMN.

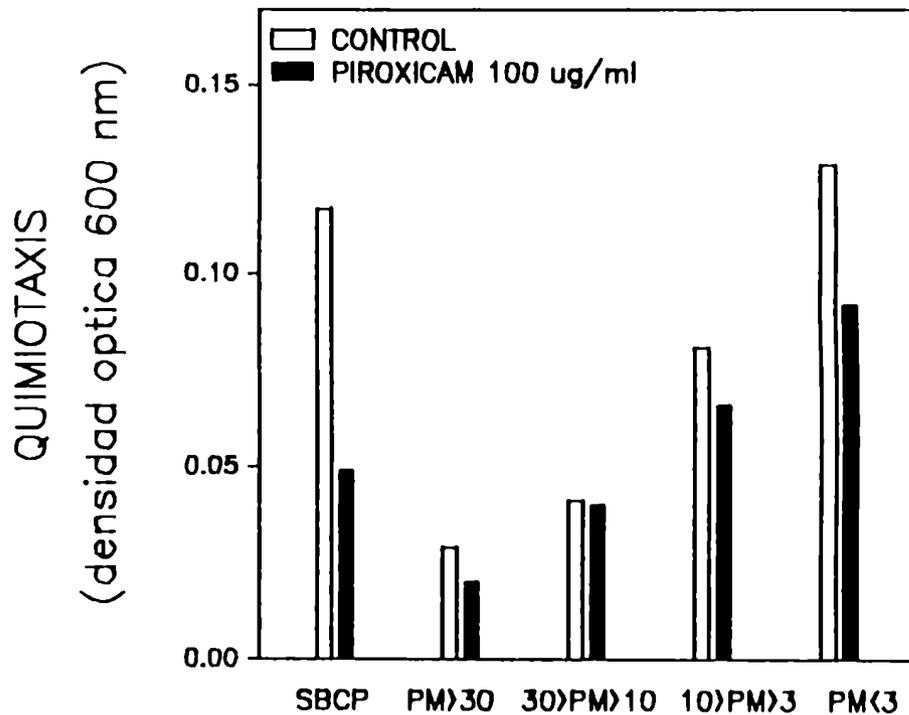


Figura 17. Efecto inhibitorio del piroxicam sobre LPMN. Se presenta la quimiotaxis de los LPMN hacia el SBCP y hacia las fracciones de distintos pesos moleculares. Cada barra representa la densidad óptica del colorante extraído de las tres áreas del filtro correspondientes a cada muestra evaluada, en un experimento representativo. El experimento se repitió 8 veces.

3.3.3. Efecto inhibitorio de DAINE sobre la quimiotaxis de LPMN pre-estimulados con IL-1.

Los experimentos previos permitieron determinar que la quimiotaxis de PMNL hacia FMLP y las quimiotactinas bacterianas es inhibida por incubación de las células con 100 ug/ml piroxicam. Posteriormente se diseñaron experimentos que permitieron

evaluar si el piroxicam inhibía la quimiotaxis de LPMN pre-activados con IL-1. Los LPMN fueron incubados con i) IL-1, 20 U por 10^6 LPMN, ii) piroxicam, 100 ug/ml, iii) IL-1 y piroxicam, y iv) HBSS. Luego de la incubación, las células fueron evaluadas en su capacidad quimiotáctica frente a 10^{-8} M de FMLP (figura 18).

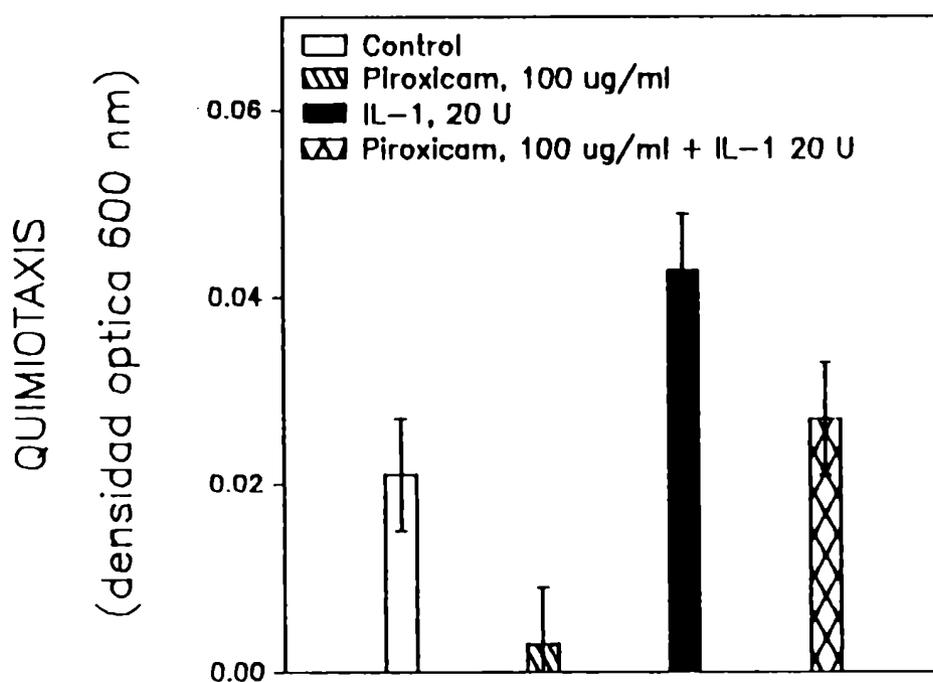


Figura 18. Efecto inhibitorio del piroxicam sobre LPMN, pre-estimulados con IL-1. Quimiotaxis de los LPMN hacia FMLP 10^{-8} M. Cada barra representa la media aritmética \pm ES de la densidad óptica del colorante extraído de las tres áreas del filtro correspondientes a cada muestra evaluada. El experimento se repitió 8 veces.

El tratamiento antiinflamatorio no modificó significativamente la

capacidad quimiotáctica frente al FMLP 10^{-8} M. Los resultados que describen las figuras 19 y 20, demuestran que el piroxicam inhibe la migración de LPMN frente a las fracciones del SBCP de PM>3 kD y PM<3 kD, pre-activados con IL-1.

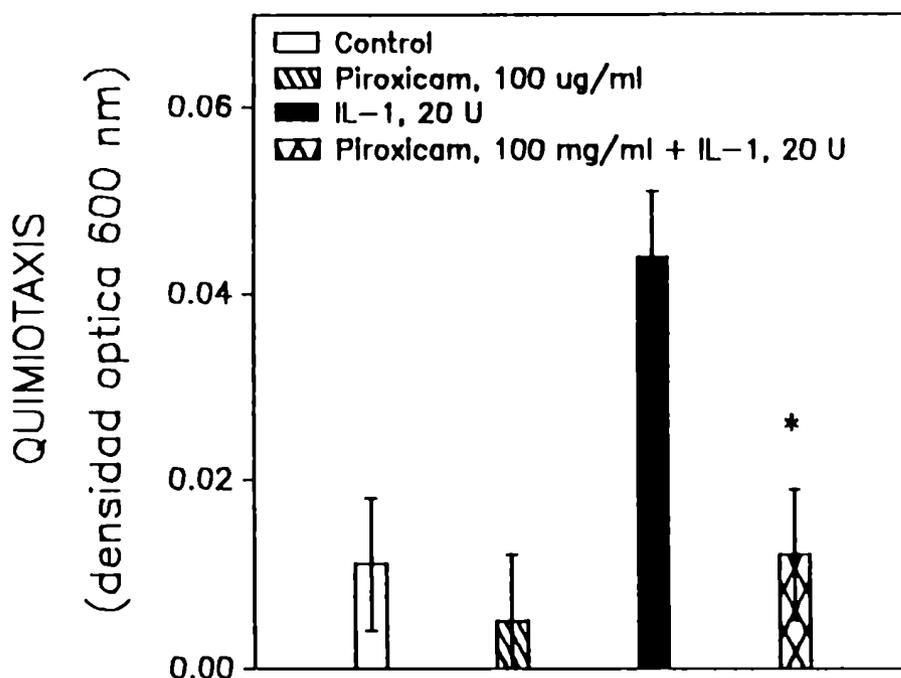


Figura 19. Efecto inhibitorio del piroxicam sobre LPMN, pre-estimulados con IL-1. Se describe la quimiotaxis de los LPMN hacia la fracción de PM>3 kD del SBCP. Cada barra representa la media aritmética \pm ES de la densidad óptica del colorante extraído de las tres áreas del filtro correspondientes a cada muestra evaluada, * $p < 0.01$ para los LPMN tratados con 100 ug/ml de piroxicam y 20 U de IL-1.

3.3.4. Conclusiones parciales.

De los resultados obtenidos en esta parte del trabajo se

observa que si bien la IL-1 no tiene un efecto significativo en la migración de LPMN hacia a FMLP o la fracción de PM>3 kD, la migración de las células hacia la fracción de PM<3 kD del SBCP se incrementó significativamente por la preincubación de las células con IL-1. El tratamiento de los LPMN con piroxicam inhibió la

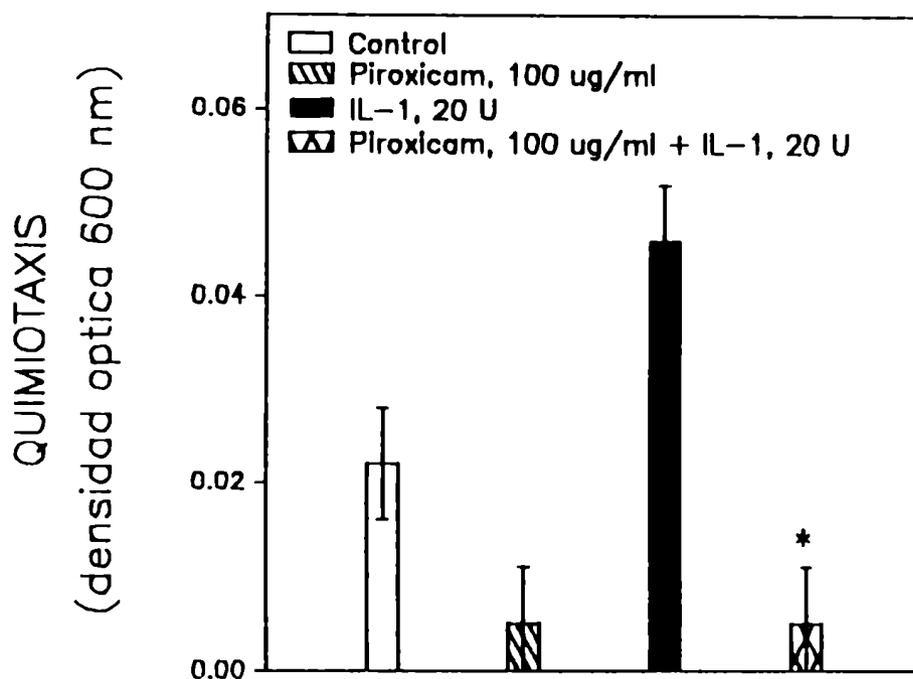


Figura 20. Efecto inhibitorio del piroxicam sobre LPMN, pre-estimulados con IL-1. Se describe la quimiotaxis de los LPMN hacia la fracción de PM<3 kD del SBCP. Cada barra representa la media aritmética \pm ES de la densidad óptica del colorante extraído de las tres áreas del filtro correspondientes a cada muestra evaluada, * $p < 0.01$ para los LPMN tratados con 100 ug/ml de piroxicam y 20 U de IL-1.

respuesta quimiotáctica, por acción directa sobre los LPMN.

Una interacción lábil y reversible del piroxicam con los receptores de péptidos quimiotácticos de los LPMN, podría explicar la pérdida del efecto antiinflamatorio cuando los LPMN fueron lavados con HBSS previamente a realizar el ensayo de quimiotaxis. El piroxicam inhibió la migración de LPMN pre-activados por IL-1 hacia los quimiotácticos bacterianos. Este resultado permite concluir que el efecto inhibitorio sobre la quimiotaxis del antiinflamatorio es independiente de la acción estimuladora de la IL-1 sobre los LPMN. Sin embargo, el tratamiento antiinflamatorio no inhibió significativamente la quimiotaxis hacia FMLP de LPMN pre-estimulados con IL-1.

3.4. SBPC: EFECTO SOBRE OTRAS FUNCIONES DE LPMN

3.4.1. Producción de anión superóxido por LPMN.

Las muestras que contenían 2.5×10^6 LPMN fueron incubadas con agitación a 37°C durante 30 min en presencia de 10^{-5} M de FMLP, o las fracciones de $\text{PM}>3$ kD y $\text{PM}<3$ kD. La determinación de la producción de anión superóxido se realizó según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados que se muestran en la tabla 1, demuestran que las quimiotactinas promueven la producción de anión superóxido.

3.4.2. Efecto promotor de la IL-1 sobre la producción de anión superóxido por LPMN.

 Tabla 1. Producción de anión superóxido por LPMN.

Estimulante	Anión superóxido [ⓐ]
control (s/estimulación)	0.49 ± 0.04
10 ⁻⁵ M FMLP	2.17 ± 0.28*
SBCP PM>3 kD	0.96 ± 0.12
SBCP PM<3 kD	2.23 ± 0.16*

[ⓐ] Media aritmética ± ES de nmoles/min/10⁶ LPMN.

*diferencia significativa con respecto al control, p<0.05.

Las muestra que contenían 2.5 x 10⁶ LPMN y 20 U de IL-1 fueron incubadas con agitación a 37°C durante 30 min. Posteriormente se agregaron como estimulantes 10⁻⁵ M de FMLP, las fracciones de PM>3 kD o PM<3 kD del SBCP y se realizó una nueva incubación en las mismas condiciones. Los resultados se muestran en la tabla 2, donde se observa que la IL-1 promueve la producción de anión superóxido por LPMN estimulados con las quimiotactinas.

3.4.3. Efecto de DAINE sobre la producción de anión superóxido por LPMN.

Las muestras que contenían 2.5 x 10⁶ LPMN fueron incubadas con 100 ug/ml de piroxicam, con agitación a 37°C durante 30 min en presencia de 10⁻⁵ M de FMLP, las fracciones de PM>3 kD o PM<3 kD del SBCP, la determinación de la producción de anión superóxido se realizó según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados demostraron que el piroxicam inhibía parcialmente la

 Tabla 2. Producción de anión superóxido por LPMN. Efecto pro motor de IL-1*.

Estimulante	Anión superóxido [ⓐ]
control (s/estimulación)	0.55 ± 0.06
control + IL-1	0.85 ± 0.25
10 ⁻⁵ M FMLP	1.63 ± 0.12*
10 ⁻⁵ M FMLP + IL-1	1.92 ± 0.05*
SBCP PM>3 kD	1.10 ± 0.28
SBCP PM>3 kD + IL-1	1.91 ± 0.43
SBCP PM<3kD	1.69 ± 0.23*
SBCP PM>3kD + IL-1	2.15 ± 0.36*

[ⓐ] Media aritmética ± ES de nmoles/min/10⁶ LPMN.

* Los LPMN fueron tratados con una dosis de 20 unidades de IL-1.
 *diferencia significativa con respecto al control correspondiente, p<0.05.

la producción de anión superóxido inducida por las quimiotactinas (tabla 3).

3.4.4. Efecto inhibitorio de DAINE sobre la producción de anión superóxido por LPMN pre-estimulados con IL-1.

Las muestras que contenían 2.5 x 10⁶ LPMN y 20 U de IL-1 fueron incubadas con agitación a 37°C durante 30 min. Posteriormente se agregaron como estimulantes 10⁻⁵ M de FMLP, las fracciones de PM>3 kD o PM<3 kD del SBCP. Se realizó una nueva incubación en presencia de 100 ug/ml de piroxicam, bajo las mismas condiciones de la incubación anterior. Los resultados de un experimento representativo se describen en la tabla 4. Se observó que

el piroxicam inhibía parcialmente la producción de anión superó-

Tabla 3. Producción de anión superóxido por LPMN. Efecto inhibidor del piroxicam*.

Estimulante	Anión superóxido ^e
control (s/estimulación)	0.55 ± 0.08
control + piroxicam	0.18 ± 0.11
FMLP 10 ⁻⁵ M	1.72 ± 0.22
FMLP 10 ⁻⁵ M + piroxicam	1.68 ± 0.15
SBCP PM>3 kD	0.88 ± 0.20
SBCP PM>3 kD + piroxicam	0.50 ± 0.11
SBCP PM<3 kD	1.42 ± 0.35
SBCP PM<3 kD + piroxicam	0.95 ± 0.16

^e Media aritmética ± ES de nmoles/min/10⁶ LPMN.

* Los LPMN fueron tratados con una dosis de 100 ug/ml de piroxicam.

xido por LPMN pre-activados con IL-1 y estimulados con las quimiotactinas.

3.4.5. Producción de quimioluminiscencia de LPMN.

La determinación de quimioluminiscencia de LPMN se realizó según se describe en Materiales y Métodos. 10 ul de LPMN en una densidad de 2 x 10⁶ céls/ml se colocaron en cada vial. Las células fueron estimuladas con zimosán 10 mg/ml y/o 10⁻⁵ M de FMLP o las fracciones de PM>3 kD y PM<3 kD del SBCP. Cada muestra fue evaluada durante 30 minutos, en un contador de centelleo líquido.

Se estudió el efecto directo del FMLP o el SBCP de PM>3 kD o PM<3 kD. Se observó que si bien los LPMN tienen una respuesta modera-

 Tabla 4. Producción de anión superóxido por LPMN. Efecto inhibitorio del piroxicam sobre LPMN pre-estimulados con IL-1*.

Estimulante	Anión superóxido [@]
control + IL-1	1.08 ± 0.40
control + IL-1 + piroxicam	0.72 ± 0.27
10 ⁻⁵ M FMLP + IL-1	1.96 ± 0.09
10 ⁻⁵ M FMLP + IL-1 + piroxicam	1.34 ± 0.70
SBCP PM>3 kD + IL-1	1.20 ± 0.35
SBCP PM>3 kD + IL-1 + piroxicam	0.78 ± 0.20
SBCP PM<3 kD + IL-1	2.67 ± 0.25
SBCP PM>3 kD + IL-1 + piroxicam	0.87 ± 0.08

 @ Media aritmética ± ES de nmoles/min/10⁶ LPMN.

* Los LPMN fueron tratados con una dosis de 100 ug/ml de piroxicam y 20 unidades de IL-1.

da cuando se los estimula con FMLP, las fracciones de PM>3 kD y PM<3 kD del SBCP no tiene efecto aparente a la concentración evaluada (figura 21).

Para determinar el efecto de las fracciones del SBCP sobre la quimioluminiscencia inducida por zimósán, se realizó el mismo experimento en presencia de las quimiotactinas. En la figura 22 se observa que las quimiotactinas no modificaron significativamente la respuesta de los LPMN activados con zimósán. Esta ob-

servación permitió deducir que la falta de respuesta de los LPMN hacia las quimiotactinas, observada en el experimento anterior, no era producto de un efecto inhibitorio sobre las células.

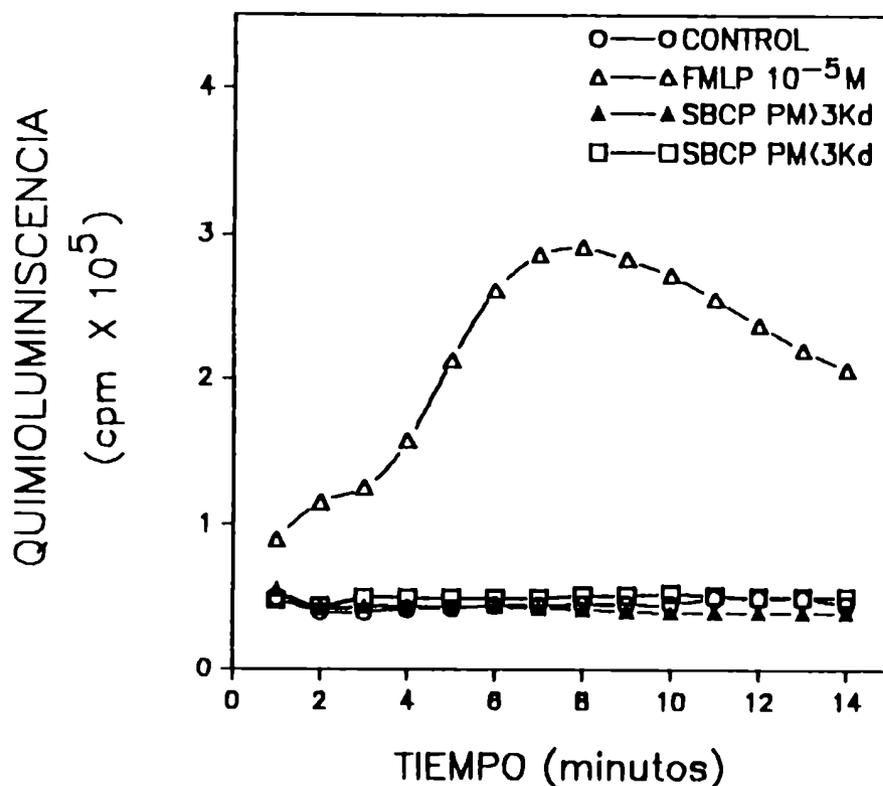


Figura 21. Quimioluminiscencia inducida por FMLP 10^{-5} M o las fracciones de PM > 3 kD y PM < 3 kD del SBCP, en un experimento representativo. El experimento fue repetido 8 veces.

A fin de evaluar el efecto de la IL-1 sobre la quimioluminiscencia producida por los LPMN, 10 μ l de las células en una densidad de 2×10^6 células/ml se colocaron en cada vial con 20 U de IL-1 y se incubaron durante 30 minutos. Los LPMN fueron estimuladas posteriormente con 10^{-5} M de FMLP o las fracciones de PM > 3

kD y PM<3 kD del SBCP. Cada muestra fue evaluada durante 30 minutos, en un contador de centelleo líquido. Los resultados del efecto directo del FMLP o el SBCP de PM>3 kD o PM<3 kD se descri-

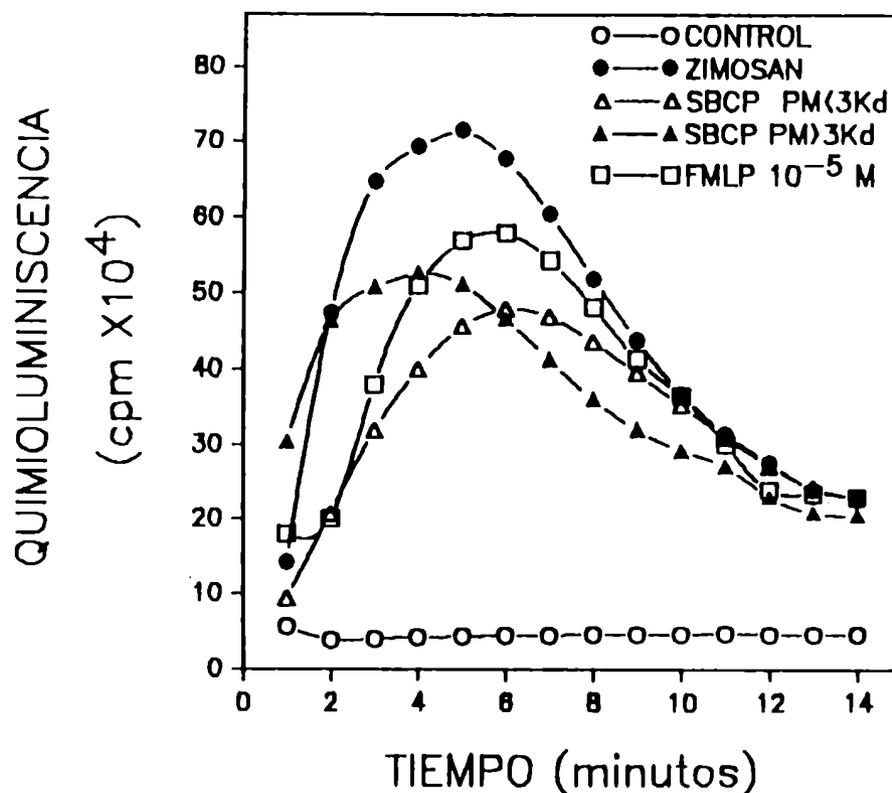


Figura 22. Quimioluminiscencia inducida por zimosán (10 mg/ml). La determinación se realizó en presencia de FMLP 10⁻⁵ M o las fracciones de PM>3 kD y PM<3 kD del SBCP, en un experimento representativo. El experimento fue repetido 8 veces.

ben en la figura 23. Se observó que la IL-1 tiene un efecto estimulante sobre la quimioluminiscencia de los LPMN activados con FMLP. Las fracciones de PM>3 kD y PM<3 kD del SBCP no inducen la quimioluminiscencia de LPMN, a pesar de la pre-estimulación con

IL-1.

3.4.6. Producción de H₂O₂ de LPMN.

La determinación de la producción de H₂O₂ por LPMN se reali-

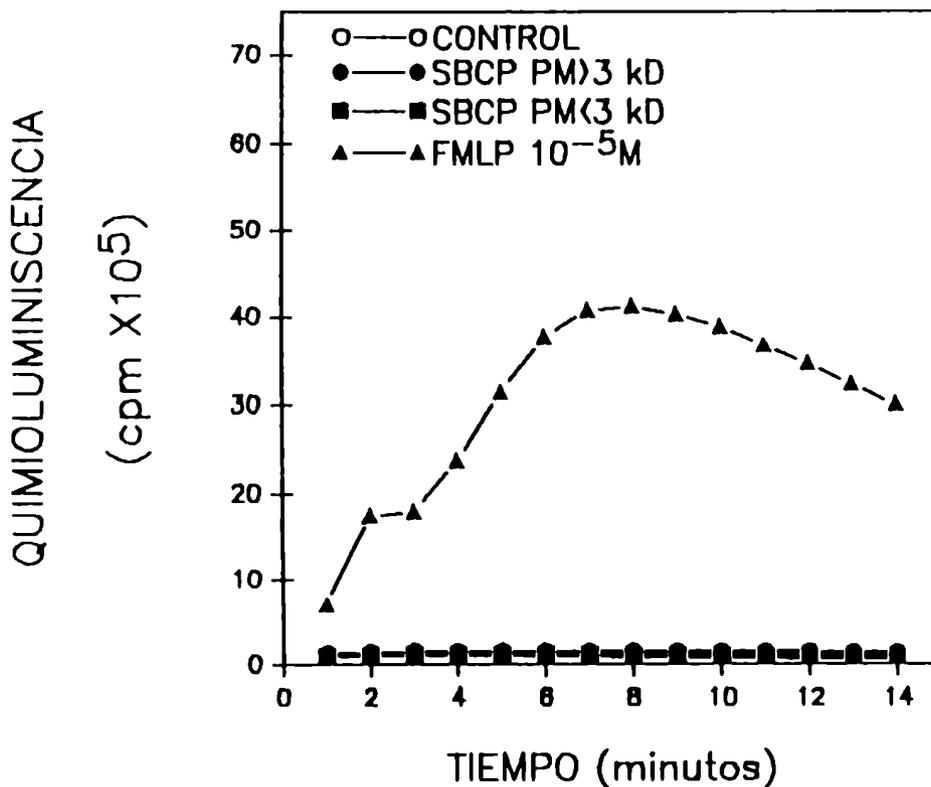


Figura 23. Quimioluminiscencia inducida por FMLP 10⁻⁵ M o las fracciones de PM > 3 kD y PM < 3 kD del SBCP. Los LPMN, fueron preincubados con 20 U de IL-1. Se describe un experimento representativo, repetido 8 veces.

zó según se describe en Materiales y Métodos. Las muestras que contenían 50 ul de LPMN en una densidad de 10⁷ céls/ml fueron incubadas con agitación a 37°C durante 30 minutos en presencia de 10⁻⁵ M de FMLP o de las fracciones de PM > 3 kD o PM < 3 kD del SBCP.

Los resultados, que se muestran en la tabla 5, permitieron demostrar que las quimiotactinas promovían la producción de peróxido de hidrógeno.

 Tabla 5. Producción de H₂O₂ por LPMN.

Estimulante	H ₂ O ₂ [@]
control (s/estimulación)	3.33 ± 0.37
FMLP 10 ⁻⁵ M	3.25 ± 0.37
zimosán (10 mg/ml)	7.83 ± 0.16*
SBCP PM>3 kD	6.13 ± 0.55
SBCP PM<3 kD	14.16 ± 0.48**

 @ Media aritmética ± ES de nmoles/10⁵ LPMN.

*diferencia significativa con respecto al control, p<0.05

** diferencia significativa con respecto al control, p<0.01.

3.4.7. Efecto promotor de la IL-1 sobre la producción de H₂O₂ de LPMN.

Las muestras que contenían una densidad de 10⁷ LPMN y 20 U de IL-1 fueron incubadas con agitación a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se agregaron como estimulantes 10⁻⁵ M de FMLP, la fracción PM>3 kD o la fracción de PM<3 kD del SBCP y se realizó una nueva incubación en las mismas condiciones. Los resultados de un experimento representativo se muestran en la tabla 6. Se observó que la IL-1 inhibía la producción de peróxido de hidrógeno por LPMN estimulados con las fracciones del SBCP o FMLP.

3.4.8. Efecto de DAINE sobre la producción de H₂O₂ de LPMN.

Las muestras que contenían una densidad de 10^7 LPMN, y/o 100 ug/ml de piroxicam fueron incubadas con agitación a 37°C durante 30 minutos. Se utilizaron como estimulantes 10^{-5} M de FMLP, la fracción PM>3 kD o la fracción de PM<3 kD del SBCP y se realizó

 Tabla 6. Producción de H_2O_2 por LPMN. Efecto promotor de la IL-1*.

Estimulante	$\text{H}_2\text{O}_2^{\text{e}}$
control (s/estimulación)	6.87 ± 0.15
control + IL-1	10.37 ± 2.00
SBCP PM>3 kD	12.50 ± 1.70
SBCP PM>3 kD + IL-1	5.25 ± 0.12
SBCP PM<3 kD	14.25 ± 0.67
SBCP PM<3 kD + IL-1	10.87 ± 1.35

 e Media aritmética \pm ES de nmoles/ 10^5 LPMN.

* Los LPMN fueron tratados con una dosis de 20 unidades de IL-1.

una incubación con agitación a 37°C durante 30 minutos. Los resultados de un experimento representativo se muestran en la tabla 7. El tratamiento de las células con el piroxicam no modificó la producción de peróxido de hidrógeno por LPMN estimulados con las quimiotactinas.

3.4.9. Conclusiones parciales.

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo demuestran que sólo la fracción de PM<3 kD del SBCP promueve la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno por los LPMN,

pero no modifican la quimioluminiscencia de las células. La qui-

Tabla 7. Producción de H₂O₂ por LPMN. Efecto del tratamiento con piroxicam.

Estimulante	H ₂ O ₂ [@]
control (s/estimulación)	13.67 ± 0.86
control + IL-1	11.00 ± 0.27
SBCP PM>3 kD	13.00 ± 0.27
SBCP PM>3 kD + IL-1	10.67 ± 0.62
SBCP PM<3 kD	16.67 ± 0.15
SBCP PM<3 kD + IL-1	14.00 ± 0.12

@ Media aritmética ± ES de nmoles/10⁵ LPMN.

mioluminiscencia inducida por zimosán no fue modificada cuando se realizó la determinación en presencia de las quimiotactinas bacterianas. De esta forma, se pudo comprobar que las células fueron activadas con el zimosán, independientemente de la presencia de las quimiotactinas lo cual indicaría que las fracciones de distinto peso molecular del SBCP no tenían un efecto inhibitorio sobre la quimioluminiscencia de los LPMN. El efecto de las quimiotactinas sobre la inducción de quimioluminiscencia, o la producción de peróxido de hidrógeno de los LPMN, no fue modificada significativamente, por la preincubación de las células con IL-1. Sin embargo la citoquina aumentó parcialmente la producción de anión superóxido. El piroxicam inhibió parcialmente la producción de anión superóxido inducida por las quimiotactinas, tanto

de las células sin pre-estimulación como de los LPMN pre-activados con IL-1.

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo demostraron que, las fracciones de distinto peso molecular del SBCP, modificaron diferencialmente las funciones de los LPMN. La fracción de PM<3 kD, activó las células en una forma semejante a lo esperado para el FMLP. Esta observación correlaciona con las evidencias acerca de que la composición de esta fracción, sería semejante a la del péptido sintético.

3.5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DAINE SOBRE LA INFECCION PULMONAR por P. aeruginosa.

3.5.1. Respuesta celular de pulmón hacia la infección con P. aeruginosa.

La exposición de ratones normales a un aerosol que contenía una cepa salvaje de P. aeruginosa o una cepa mutante termosensible de la misma bacteria (figura 24) produjo una respuesta inflamatoria caracterizada por la migración de LPMN al pulmón.

Cuando se desafió ratones granulocitopénicos con la cepa salvaje los animales desarrollaron una neumonía hemorrágica y la mortalidad es del 100%, dentro de las 24 horas posteriores al desafío (LD50 < 500 UFC). En contraste, cuando el desafío fue

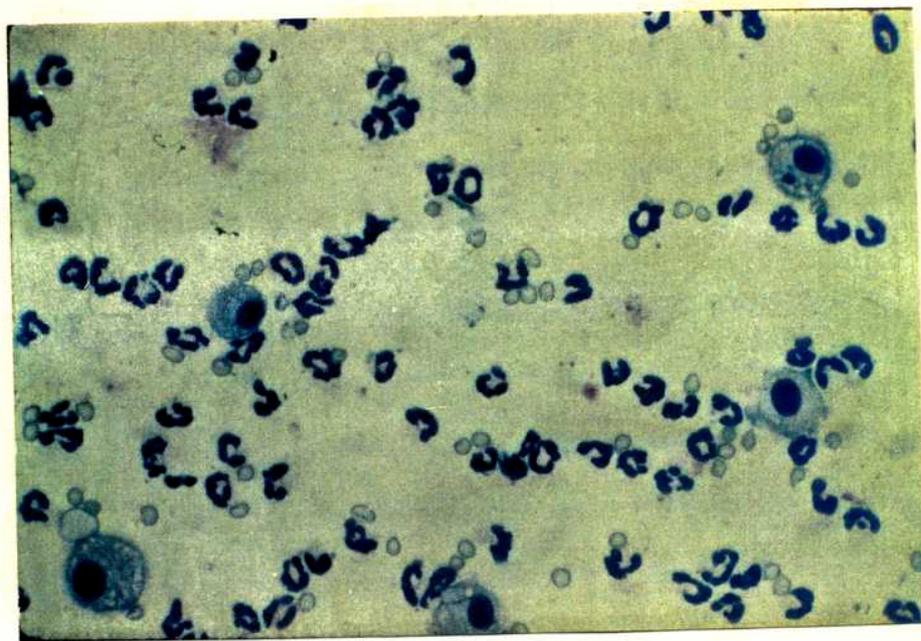
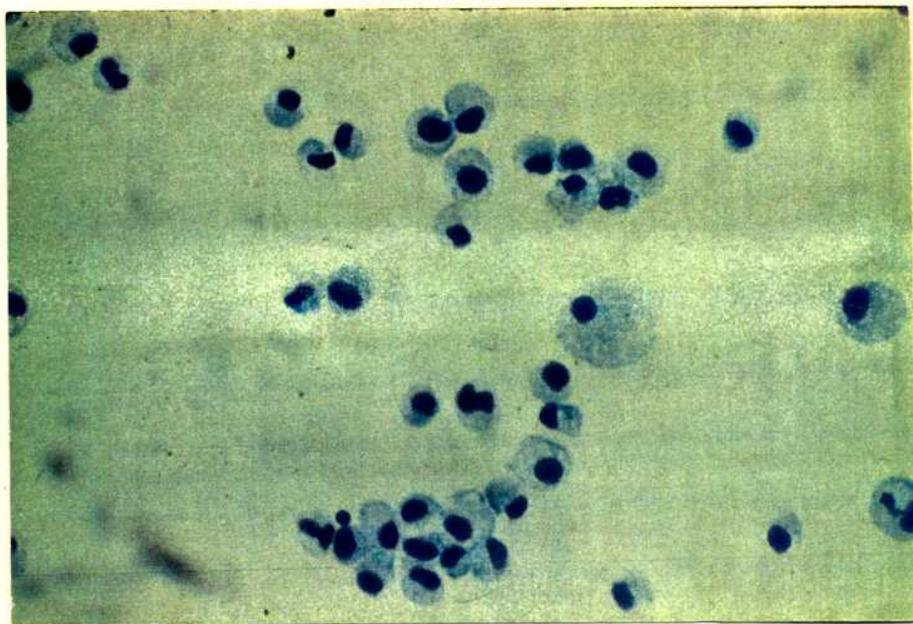


Figura 24. Fotografía superior: población celular de fluido de lavado pulmonar de ratones que no fueron aerosolizados (625x). Fotografía inferior: población celular de fluido de lavado pulmonar, 4 horas luego del aerosol de *P. aeruginosa* (625x).

realizado con la mutante termosensible E\9\9, en dosis similares a la usadas para la bacteria salvaje, la sobrevivencia fue del 100% (tabla 8). Dado que tanto la cepa salvaje como la mutante termosensible fueron capaces de atraer un número similar de LPMN hacia el pulmón e indujeron cambios histopatológicos de similar

 Tabla 8. Inflamación pulmonar inducida por el desafío con un aerosol de P.aeruginosa.

desafío*	mortalidad%	LPMN [!]	Patología [@]
<u>P. aeruginosa</u>			
ratón normal	0	(1.2±0.2) x 10 ⁶	(+++)
ratón granuloc.	100	<1 x 10 ⁴	(ND)
E\9\9			
ratón normal	0	(1.1±0.1) x 10 ⁶	(++)
ratón granuloc.	0	<1 x 10 ⁴	(-)
Solución salina			
ratón normal	0	<1 x 10 ⁴	(-)

 * El desafío fue realizado con 6-8 x10⁵ ufc/animal
 ! Los datos son la media aritmética ± ES del número de LPMN en los líquidos de lavados recogidos 4 horas luego del desafío con el aerosol.

@ Cortes del tejido pulmonar fueron evaluados con respecto a la congestión y a la infiltración peribronquial y perivascular; (+) = comparativamente mayor, (-) = sin, ND= no determinada. Los animales fueron sacrificados 48 horas luego de la exposición al aerosol. La observación de los pulmones de los ratones granulocitopénicos que recibieron P. aeruginosa aerosolizada, reveló la presencia de una extensa hemorragia y consolidación.

magnitud, los ratones granulocitopénicos expuestos a un aerosol

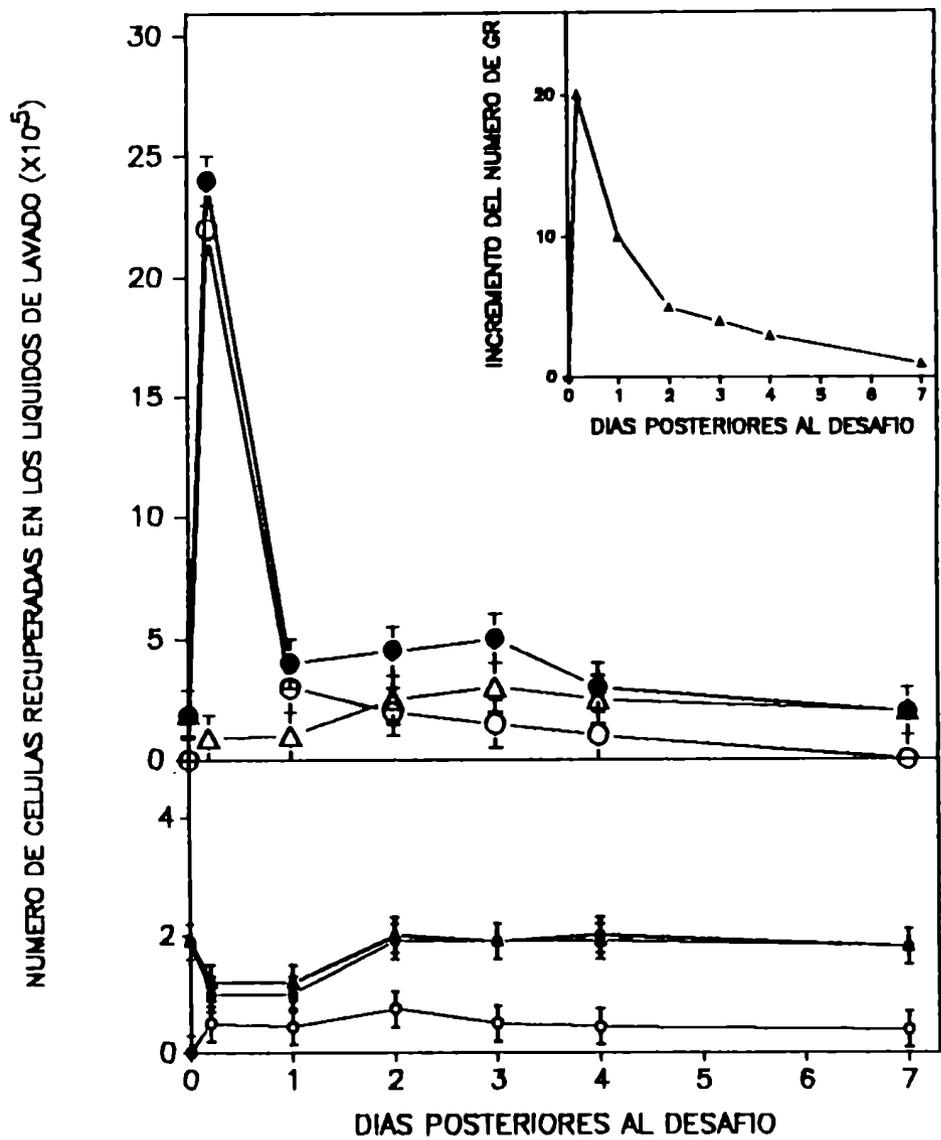


Figura 25. Respuesta celular pulmonar hacia la mutante termosensible E/9/9 de *P. aeruginosa* en ratones normales (gráfico central) y ratones granulocitopénicos (gráfico inferior). Cada punto representa la media aritmética \pm ES (n=6-8) del número de células recuperadas de los líquidos de lavado luego del desafío con el aerosol. El incremento en el número de glóbulos rojos (GR) en los líquidos de lavado de los ratones normales con los ratones granulocitopénicos se describe en el inserto (gráfico superior).

magnitud, los ratones granulocitopénicos expuestos a un aerosol de la mutante E\9\9 fue considerado un modelo válido para el estudio de la respuesta celular de pulmón durante un período mayor a una semana. Se observó una respuesta celular bifásica hacia la mutante termosensible E\9\9, en los animales normales, (figura 25), mientras que la presencia de LPMN y macrófagos alveolares fue totalmente inhibida en los ratones granulocitopénicos (figura 25). El número de glóbulos rojos en los líquidos de lavado, un signo temprano de la injuria tisular, fue significativamente menor en los animales granulocitopénicos, comparados con el número determinado para los ratones controles, a las 4, 24, y 48 horas luego del desafío con el aerosol de la mutante termosensible E\9\9 (figura 25, inserto). Un porcentaje del 78% del inóculo inicial de la mutante E\9\9 fue depurado en los pulmones de los ratones normales a las 4 horas del desafío, mientras que un 81% fue depurado en los pulmones de los ratones granulocitopénicos en el mismo período (las diferencias no fueron significativas). Más del 99% del inóculo inicial fue depurado dentro de las 24 horas y la depuración se completó dentro de las 48 horas, similarmente a lo que ocurrió con la cepa salvaje.

3.5.2. Efecto de las DAINE sobre la respuesta celular de pulmón.

La respuesta de LPMN hacia las vías respiratorias bajas en respuesta a un aerosol de P. aeruginosa fue modulada por el tratamiento por piroxicam en una relación dosis-respuesta (figura 26). El estudio histoquímico reveló que el 90%-95% de las células mi-

gradadas fueron LPMN. No existieron diferencias significativas entre los ratones tratados y controles con respecto al número de macrófagos alveolares (MA) determinado 4 horas posteriormente al desafío. La magnitud de la respuesta de LPMN y MA fue baja en los animales tratados con 0.2 mg/Kg de piroxicam, mientras que la duración de la respuesta celular (figura 27) no se vio afectada

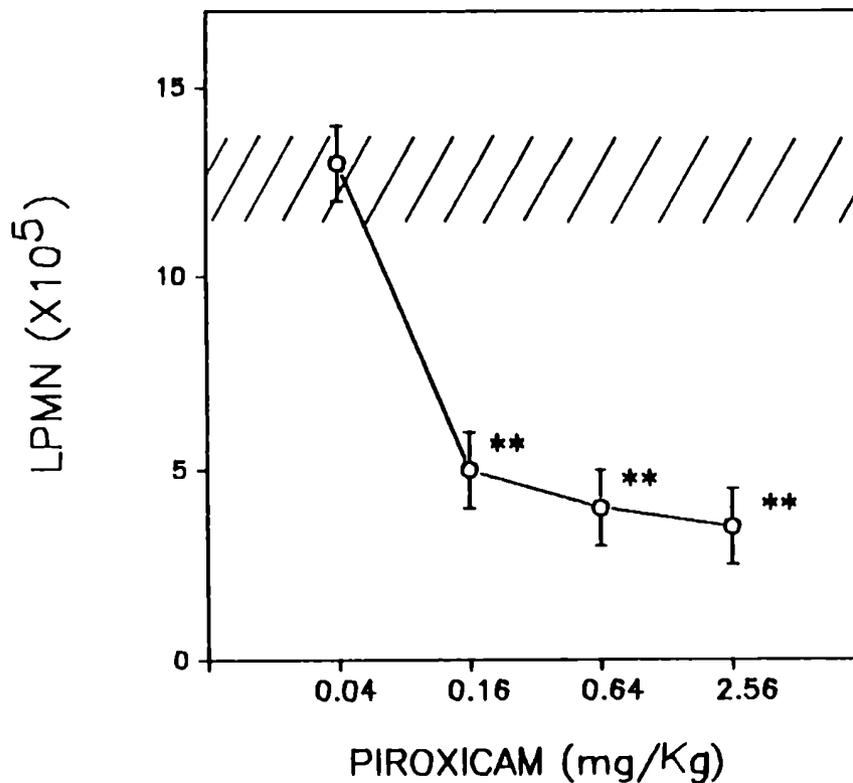


Figura 26. Efecto del tratamiento con piroxicam sobre el número total de LPMN recuperados de los líquidos de lavado de ratones, 4 horas después del desafío con un aerosol de P. aeruginosa. Los ratones fueron tratados con las dosis que se indican, 42, 26 y 2 horas antes de la exposición al aerosol. Cada punto representa la media aritmética \pm ES de los datos de 6 a 8 ratones. El área rayada representa la media aritmética \pm ES del número de LPMN recuperados de los ratones no tratados y expuestos al aerosol. Diferencias significativas, ** $p < 0.01$ para la disminución del número de LPMN en ratones tratados con 0.16, 0.64 o 2.56 mg de piroxicam/Kg.

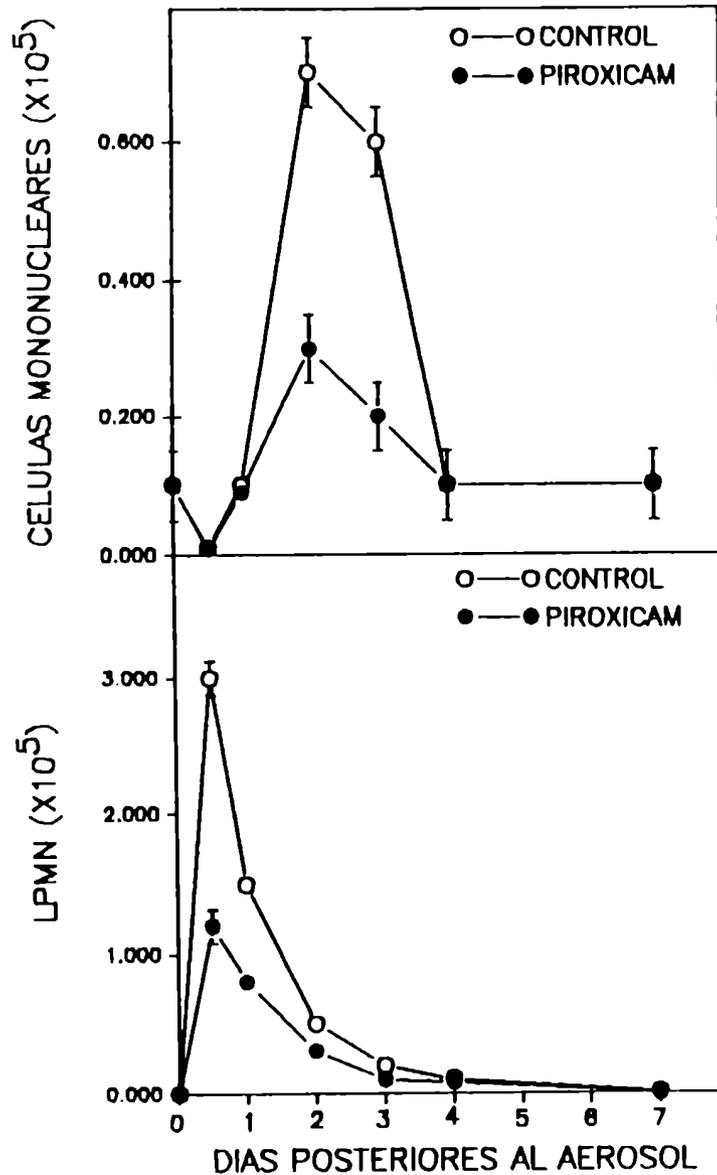


Figura 27. Efecto de 0.2 mg de piroxicam/Kg por día en la respuesta de [a] células mononucleares y [b] LPMN al desafío con *P. aeruginosa*. Cada punto representa la media aritmética \pm ES de los datos de 6 a 8 ratones. Diferencias significativas, * $p < 0.01$ para el número total de LPMN recuperados 4 y 24 horas posteriores al desafío en los líquidos de lavado de ratones tratados con piroxicam. Diferencias significativas, ** $p < 0.01$ para el número total de células mononucleares recuperadas 2 o 3 días posteriormente al desafío.

por el tratamiento. En ambos casos, la línea de base de LPMN yMA fue recuperada cuatro días luego del desafío con $6-8 \times 10^5$ cfu de P. aeruginosa. Los ratones fueron sacrificados 21 días después del desafío por aerosol con P. aeruginosa. Los animales controles fueron expuestos a un aerosol con solución salina.

La evaluación de los cortes de tejido pulmonar (figura 28), revelaron que el tratamiento con piroxicam previene significativamente la infiltración perivascular en una relación dosis-respuesta (figura 29). La infiltración peribronquial también disminuyó, aunque en forma no significativa.

3.5.3. Efecto protector del piroxicam.

A fin de determinar el efecto del tratamiento con piroxicam sobre las defensas pulmonares anti-Pseudomonas, se aerosolizaron ratones normales con una dosis de $6-8 \times 10^6$ cfu intrapulmonares de P. aeruginosa. De los ratones no tratados, el 63% murieron, mientras que el tratamiento el antiinflamatorio disminuyó significativamente la muerte de los ratones producida por la infección con P. aeruginosa, en una relación dosis-respuesta (tabla 9).

La cepa de P. aeruginosa utilizada no fue susceptible a 25.6 ug de piroxicam/ml en un ensayo de actividad bactericida, in vitro de difusión en agar. Los pulmones de los animales que murieron luego de la aerosolización mostraron signos patológicos macroscópicos característicos, con hemorragia y consolidación involucraba más del 90% del órgano. Los experimentos de depura-

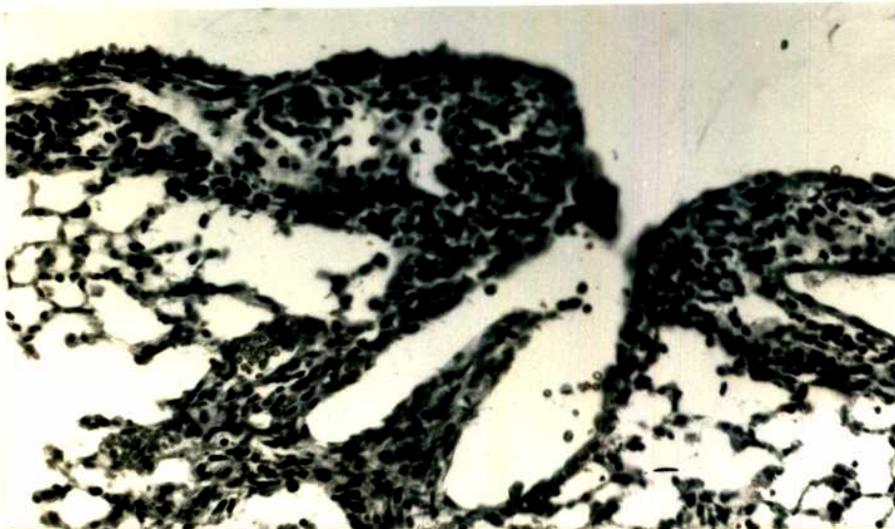
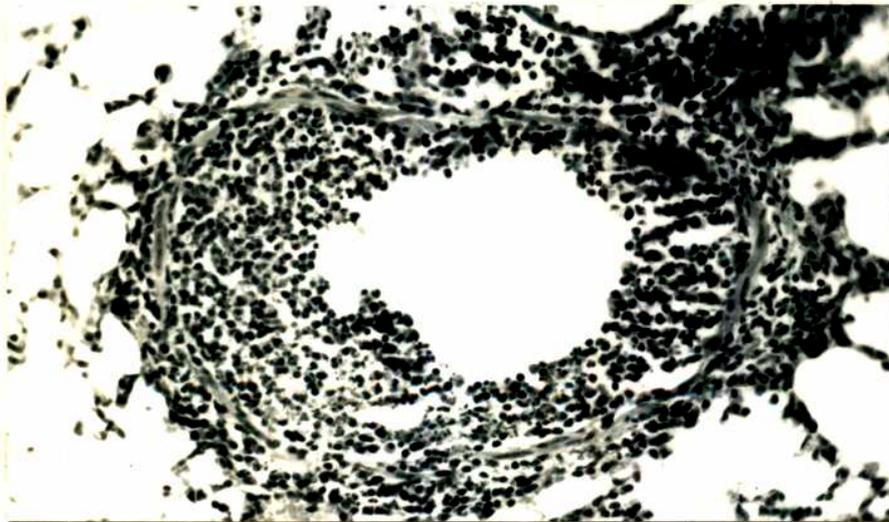
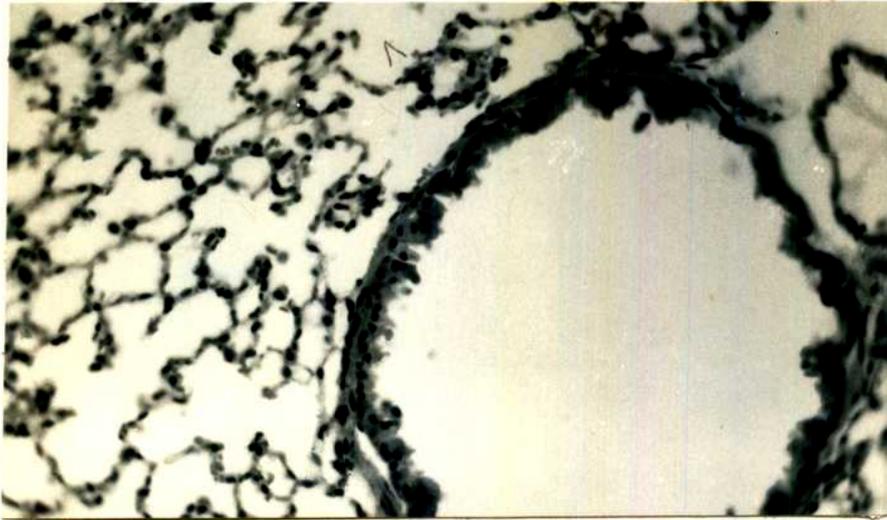


Figura 28. Inhibición parcial de la migración de LPMN hacia el pulmón de ratones tratados con 0.3 mg/Kg de piroxicam. Las fotografías muestran secciones de vasos obtenidos de cortes de pulmón teñidos con hematoxilina-eosina de ratones, no tratados, no desafiados (fotografía superior), no tratados y desafiados con un aerosol de P. aeruginosa (fotografía central) y, ratones desafiados con el aerosol y tratados con piroxicam (fotografía inferior).

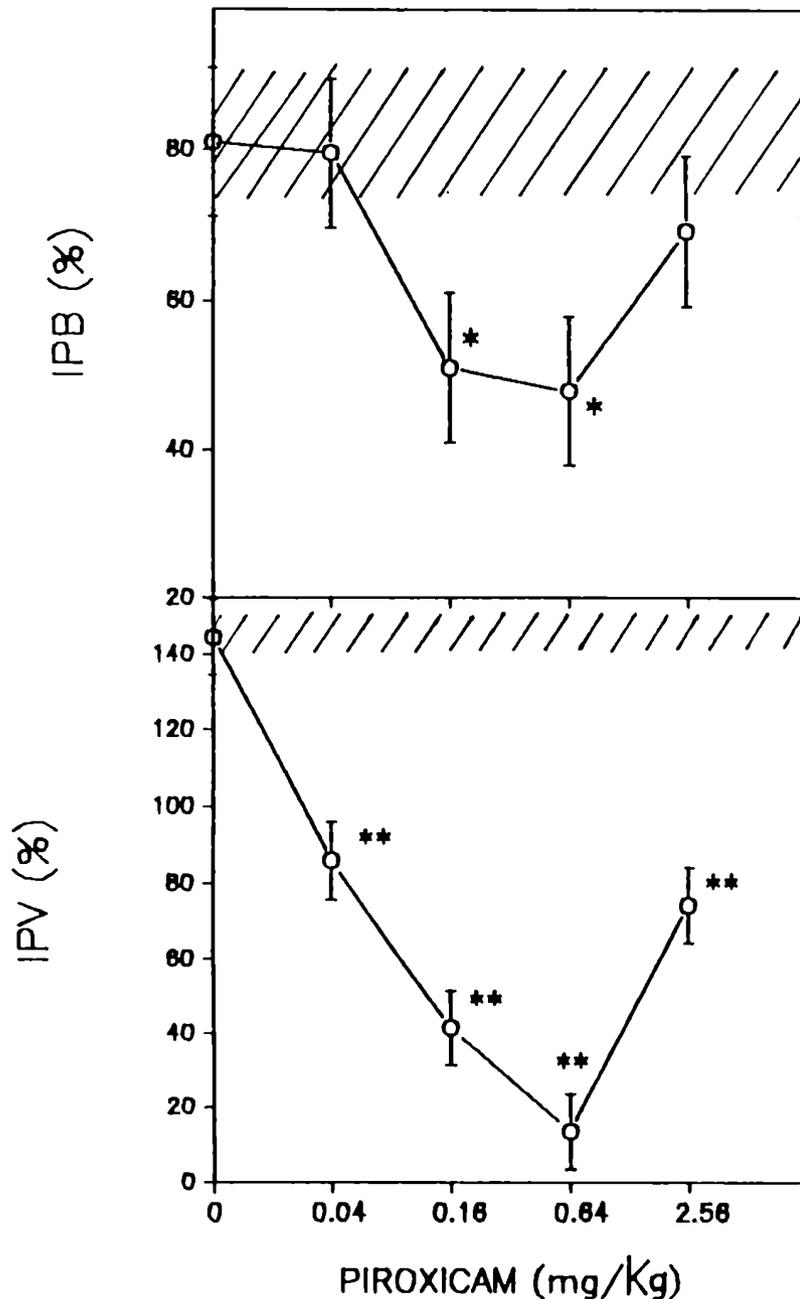


Figura 29. Determinación cuantitativa de la infiltración perivascular (IPV) y peribronquial (IPB) (definida en Materiales y Métodos) de los pulmones de ratones tratados con las dosis que se indican de piroxicam y desafiados con un aerosol de *P. aeruginosa*. Cada punto representa la media aritmética \pm ES de 10-15 secciones de bronquios o vasos sanguíneos. Las áreas rayadas representan la media aritmética \pm ES de las secciones obtenidas de pulmones de ratones no tratados y expuestos al aerosol. Diferencias significativas, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

ción pulmonar, 4 horas después del desafío con el aerosol, reveló que el 56% de las cfu no fueron removidas de los pulmones de los animales controles, mientras que el 42%, 41%, 47% y 51% de ufc permanecieron en los pulmones de los ratones tratados con dosis de 0.04, 0.16, 0.64 y 2.56 mg/Kg, respectivamente.

 Tabla 9. Efecto protector del piroxicam sobre ratones normales desafiados con un aerosol de P. aeruginosa.

tratamiento, dosis (mg/ml)	nº de ratones muertos/ nº total de ratones (%)	p*
salina	12/19	-
piroxicam		
0.04	10/19 (53)	NS
0.16	4/17 (24)	0.040
0.64	1/18 (6)	0.009
2.56	4/18 (22)	0.030

 *Nivel de significación de las diferencias en la mortalidad de los ratones tratados con piroxicam comparados con el grupo control (ratones tratados con solución salina), determinado por el test de X_2 ; NS, no significativo.

En otra serie de experimentos se evaluó la capacidad protectora del antiinflamatorio, suministrado por vía de aerosoles, 4 horas después del desafío con P. aeruginosa. El 100% de los animales tratados sobrevivieron, mientras que solo el 50% de los animales controles sobrevivió al desafío con P. aeruginosa (P=0.043). Los resultados aunque no son concluyentes, sugieren que el tratamiento con el antiinflamatorio protege a los animales

tratados posteriormente al desafío con P. aeruginosa. Esta observación es un indicio de que el antiinflamatorio no sólo protege a los animales inhibiendo la migración de los LPMN al pulmón sino que la administración posterior al tiempo al cual se sabe que las células llegan al órgano.

3.5.4. Conclusiones parciales.

Los datos obtenidos en el modelo in vivo estarían confirmando los resultados obtenidos en los experimentos in vitro, donde se demuestran que el piroxicam no sólo inhibe la migración de células sino también las funciones relacionadas con la liberación de especies reactivas del oxígeno, lo que conduce al daño del tejido pulmonar y es una de las causas de daño tisular inducido por las infecciones por P. aeruginosa.

3.6. EFECTO IN VIVO DEL TRATAMIENTO CON DAINE SOBRE LA QUIMIOTAXIS DE LPMN INDUCIDA POR EL SBCP.

3.6.1. Efecto de las DAINE sobre la respuesta LPMN en el pulmón.

En la etapa final de este trabajo se estudió la migración in vivo de LPMN inducida por FMLP o el SBCP y su modulación por drogas antiinflamatorias no esteroideas. Los ratones fueron tratados con piroxicam, durante 5 días antes de realizar la nebulización con los quimiotácticos. Posteriormente, se realizó el recuento de los LPMN migrados, en los líquidos de lavado pulmonar,

obtenidos 4 horas después del desafío. Los resultados obtenidos confirman que las quimiotactinas bacterianas así como con el quimiotáctico sintético tienen por si mismos capacidad de atraer LPMN hacia el pulmón en ausencia del microorganismo entero (figura 30).

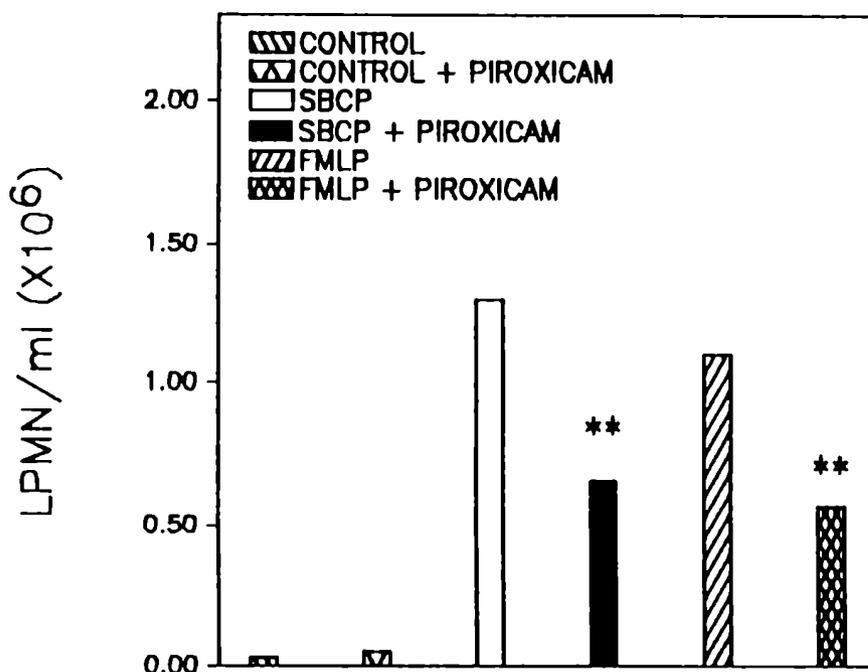


Figura 30. Efecto del tratamiento con piroxicam, sobre el número total de LPMN recuperados de los líquidos de lavado de ratones, 4 horas después del desafío con un aerosol del SBCP o FMLP. Los ratones fueron tratados con la dosis que se indica, durante 5 días previos a la exposición al aerosol. Diferencias significativas, ** $p < 0.01$ para la disminución del número de LPMN en ratones tratados con 0.64 mg de piroxicam/Kg por día. Cada barra representa la mediana de los datos de 6 a 8 ratones.

3.6.2. Efecto del SBCP sobre los niveles de MPO en pulmón.

Si bien los resultados de recuento de LPMN en los líquidos de lavado pulmonar muestran una clara evidencia del efecto inhibitorio del antiinflamatorio, es necesario tener en cuenta que las quimiotactinas no sólo inducen la migración de los LPMN, sino que también activan estas células. Esta última consideración se corresponde con las observaciones realizadas durante los recuentos, donde se encontraron gran cantidad de células destruidas, lo cual podría considerarse un hecho consecuente a la activación de los LPMN. A fin de investigar esta última consideración, se realizaron determinaciones de MPO en homogenatos de pulmón de ratones desafiados con las quimiotactinas y tratados con el antiinflamatorio.

Se realizó una modificación de un método previamente descrito, que permitió correlacionar la cantidad de esta enzima en homogenatos de pulmón de ratones con diferentes tratamientos y las células que migraron. Se determinó espectrofotométricamente la concentración de MPO en los sobrenadantes de homogenatos de pulmón de ratones aerosolizados con las quimiotactinas bacterianas y/o tratados con piroxicam, según la metodología descrita previamente. Los animales fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital sódico y se realizó la perfusión del pulmón a fin de extraer la hemoglobina que, se sabe, interfiere con la determinación de MPO. Los pulmones fueron colocados en 1 ml de PBS, homogeneizados y sonicados a 70W, 2 veces por 15 seg., cada vez. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 3000 RPM

por 10 min. En 20 μ l de los sobrenadantes obtenidos se realizó la determinación espectrofotométrica de la concentración MPO, usando 3,3',5,5'tetrametil-benzidina como sustrato. Los resultados obtenidos se describen en la figura 31. Se observó un

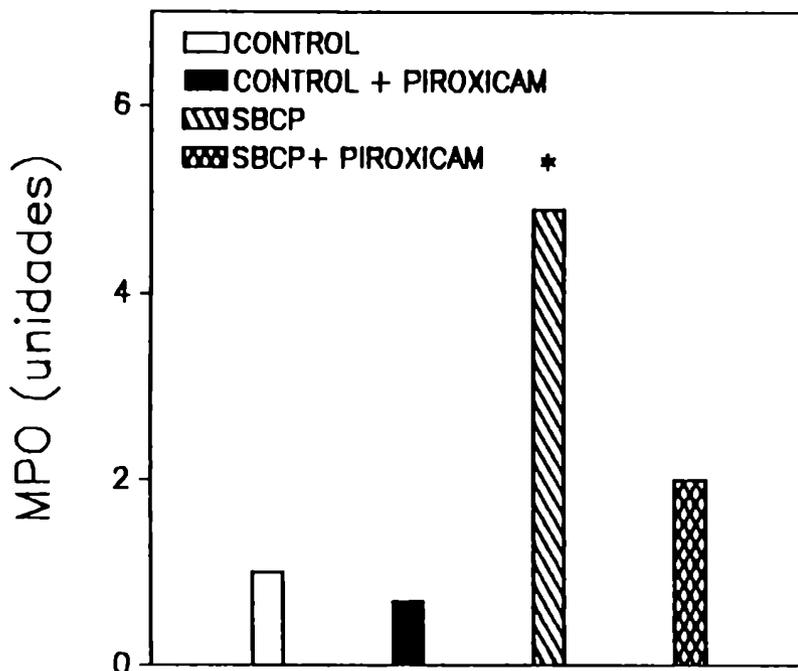


Figura 31. Efecto del tratamiento con piroxicam, sobre los niveles de MPO, determinados en los sobrenadantes de homogenatos de pulmón, 4 horas después del desafío con un aerosol del SBCP o FMLP. Los ratones fueron tratados con la dosis que se indica, durante 5 días previos a la exposición al aerosol. Cada barra representa la mediana de los datos de 6 a 8 ratones. Diferencias significativas, * $p < 0.05$.

aumento en los niveles de MPO en los animales desafiados con el SBCP. Los niveles de MPO en los homogenatos de pulmón de los

animales que fueron tratados con el antiinflamatorio y desafiados con el SBCP disminuyeron con respecto a los niveles de MPO determinados para los animales no tratados. Los resultados obtenidos mediante la determinación de MPO, se correlacionan con los obtenidos para el recuento de células en líquidos de lavados. El método resultó un buen parámetro de determinación del daño de tejido.

3.6.3. Efecto del tratamiento con piroxicam sobre los niveles de proteínas en pulmón.

Trabajos anteriores de otros autores han demostrado que los altos niveles de proteínas en líquidos de lavados pulmonares se correlacionan con el daño del tejido pulmonar. A fin de determinar el efecto del SBCP sobre los niveles de proteínas solubles, se evaluó el contenido de las mismas en los líquidos de lavado de pulmones de ratones, realizados 4 horas después del desafío con el SBCP. Los resultados obtenidos se observan en la figura 32, donde se demuestra que los niveles de proteínas en los líquidos de lavados aumentaron significativamente en los animales desafiados con el SBCP. También se observó que el tratamiento de los animales con piroxicam disminuyó significativamente la concentración de proteínas en los líquidos de lavado.

3.6.4. Efecto de complejos piroxicam-cobre sobre la migración in vivo de LPMN.

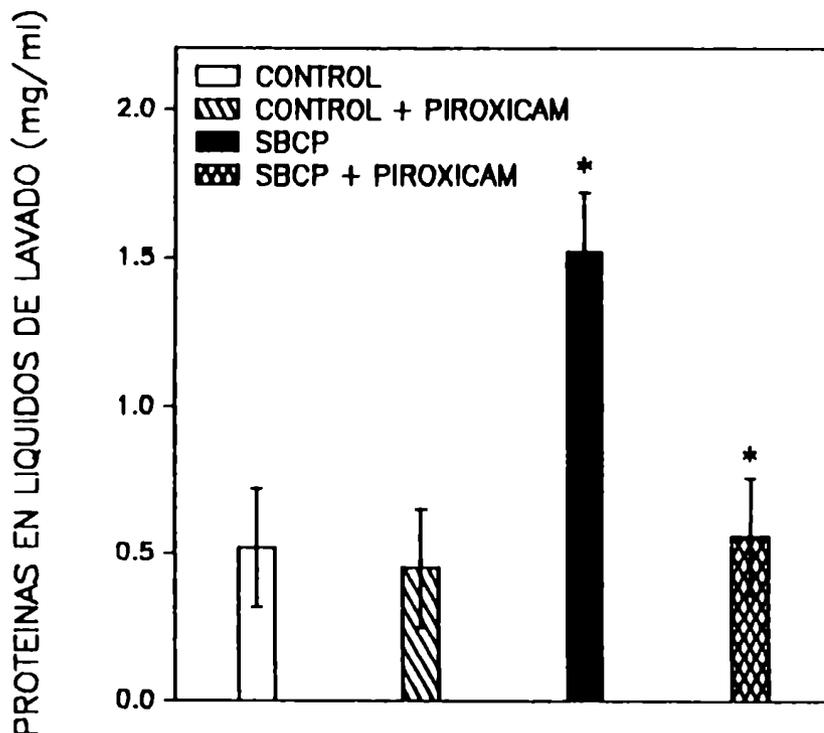


Figura 32. Concentración de proteínas solubles en líquidos de lavado pulmonar, recuperados 4 horas posteriores al desafío con un aerosol del SBCP. Cada barra representa la media aritmética \pm ES de la concentración de proteínas de los líquidos de lavado de 6 ratones. Diferencias significativas, * $P < 0.01$ para el aumento de la concentración de proteínas de los líquidos de lavado de los ratones desafiados con un aerosol del SBCP. Diferencias significativas, ** $P < 0.01$ para la disminución en la concentración de proteínas de los líquidos de lavado de los ratones tratados durante 5 días previos al aerosol con una dosis de 0.64 mg de piroxicam/Kg/día.

Trabajos anteriores ha atribuido el efecto protector de los DAINES a su capacidad de formar quelatos con Cu^{2+} y ejercer actividad de superóxido dismutasa (SOD). La capacidad SOD del piroxicam complejo con Cu^{2+} según se ha descrito previamente, fue evaluada previamente in vitro. Los complejos piroxicam- Cu^{2+}

(10^{-4} M, 1:1 Cu^{2+} :piroxicam) inhibieron la reducción del ferricitocromo C catalizada por el anión superóxido, en forma dosis-respuesta dependiente (figura 33).

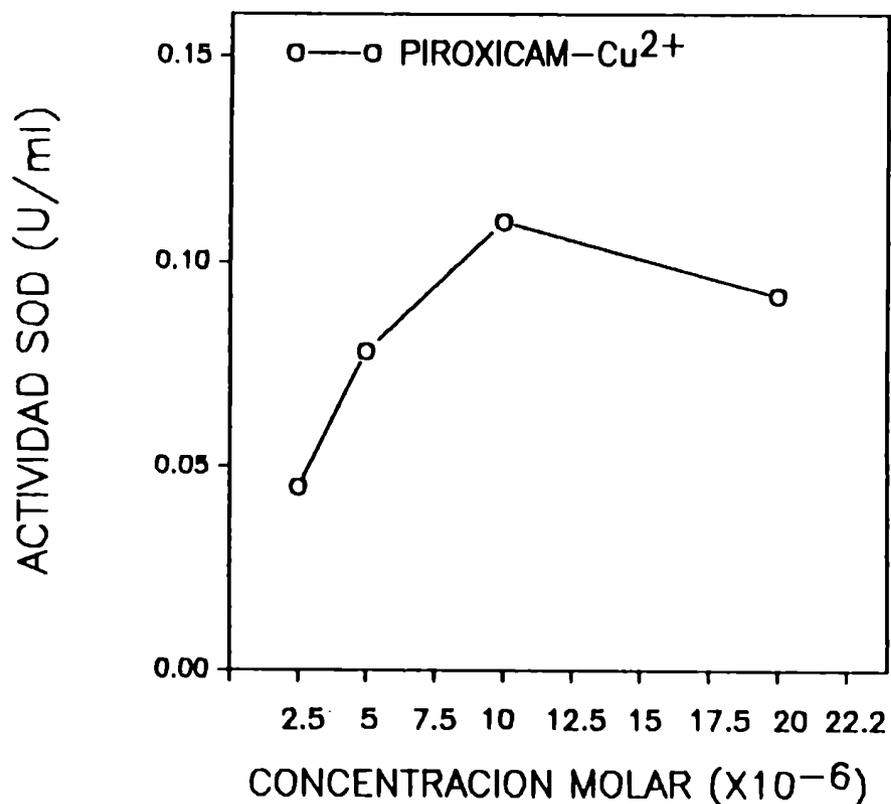


Figura 33. Actividad SOD de los complejos piroxicam- Cu^{2+} . Cada punto corresponde a la actividad SOD de las concentraciones que se indican del complejo, determinada por el método de reducción del ferricitocromo C, en un experimento representativo.

El antiinflamatorio solo, sin Cu^{2+} no demostró tener capacidad SOD por sí mismo, pero el cobre en concentración 10^{-4} M inhibió la reducción del ferricitocromo C en forma similar a la que lo hicieron los complejos (figura 34).

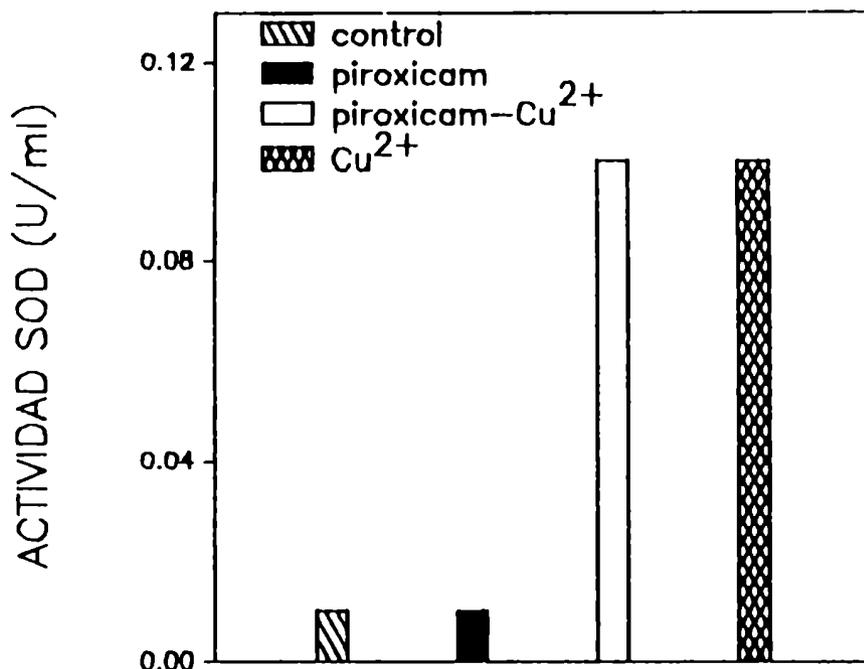


Figura 34. Actividad SOD de los complejos piroxicam-Cu²⁺ y de Cu²⁺. Cada barra corresponde a la actividad SOD, de las concentraciones que se indican de los complejos, determinada por el método de reducción del ferricitocromo C, en un experimento representativo. El experimento fue repetido 5 veces.

A fin de evaluar el efecto del antiinflamatorio de los complejos, se realizaron experimentos semejantes a los que se describen previamente para la evaluación del efecto in vivo del antiinflamatorio solo. Los ratones fueron tratados durante 5 días previos al desafío con un aerosol del SBCP. Las dosis utilizadas fueron equivalentes a las evaluadas en los experimentos in vitro y demostraron ser tan efectivos como el antiinflamatorio

solo en la inhibición de la migración de LPMN hacia el pulmón. Los resultados se muestran en la figura 35.

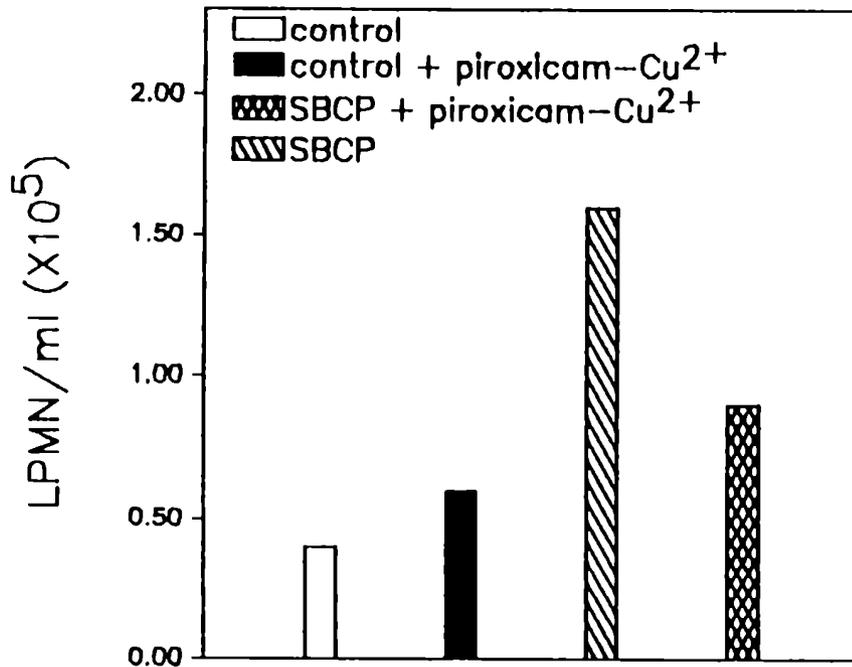


Figura 35. Efecto del tratamiento con el complejo piroxicam-Cu²⁺ sobre el número total de LPMN recuperados de los líquidos de lavado de ratones, 4 horas después del desafío con un aerosol del SBCP. Los ratones fueron tratados con la dosis que se indica, durante 5 días previos a la exposición al aerosol. Cada barra representa la mediana de los datos de 6 a 8 ratones. El experimento fue repetido 5 veces.

3.6.5. Conclusiones parciales.

Todos los métodos utilizados para evaluar el daño de tejido in vivo, permitieron demostrar que tanto el microorganismo entero como los exoproductos con actividad quimiotáctica de P. aerugino-

sa son importantes inductores de la injuria del tejido pulmonar durante la infección. Así mismo el tratamiento antiinflamatorio resultó efectivo en la regulación de la migración de LPMN y la posterior activación de sus funciones relacionadas con el metabolismo del oxígeno en el órgano infectado o desafiado con las quimiotactinas bacterianas. También se pudo establecer la actividad superóxido dismutasa del Cu^{2+} quelado por el antiinflamatorio. Este hallazgo, indicaría un mecanismo de protección adicional del las DAINE sobre el daño de tejido pulmonar inducido por los factores bacterianos y los productos de liberación de LPMN.

Discusión

4.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS QUIMIOTACTINAS DE P. aeruginosa.

Los productos de origen bacteriano con actividad quimiotáctica y quimiotaxigénica ha sido extensamente estudiados debido a su importancia como inductores de inflamación (28,54,65,86,140,-146). A pesar que la acumulación de LPMN parece ser una de las mayores causas de la inducción de patogénesis durante la inflamación aguda, poco es lo que se conoce a cerca del efecto de los péptidos quimiotácticos bacterianos sobre los eventos fisiopatológicos que ocurren durante una infección por P. aeruginosa. En estudios previos de nuestro equipo se demostró que P. aeruginosa y Staphylococcus aureus liberan quimiotactinas en cultivo (117). En este trabajo de tesis se demostró que las quimiotactinas tienen muchas características en común con péptidos de bajo peso molecular como describieron Schiffman y col. en su clásico estudio con E. coli (111) y Marasco y col. posteriormente (70). El análisis de secuenciación no se realizó en este trabajo, pero se encontró una fuerte evidencia de que la mayor actividad quimiotáctica del SBCP proviene de factores con características peptídicas. La liberación de péptidos de bajo peso molecular no sólo ha sido demostrada para E. coli sino que también existen descripciones de otros autores que establecen la liberación de tetrapéptidos por Staphylococcus aureus (53). Se pudo comprobar que las sustancias peptídicas con actividad quimiotáctica liberadas por P. aeruginosa no pertenecían a una única especie. Se otorgaron fuertes evidencias de que las quimiotactinas bacterianas

actúan sobre los receptores para FMLP. Distintos grados de afinidad a estos receptores (114, 125) y distintos grados de potencia de los componentes del SBCP podrían ser la causa de la respuesta diferencial de las fracciones de distinto peso molecular, con respecto a las funciones evaluadas de los LPMN.

Debe considerarse que las fracciones utilizadas en los diferentes ensayos, no fueron totalmente purificadas, por lo tanto no puede ignorarse la posibilidad de que las fracciones de distinto peso molecular incluyeran otras sustancias que modificaran las respuestas biológicas de los LPMN. Otras sustancias quimiotácticas de distinta composición química liberadas por P. aeruginosa, como los ramnolípidos, han sido descritas por Shryock y col. (113). La relativa contribución de la fracción lipídica a la actividad quimiotáctica del SBCP, in vitro, sugirió que la actividad de los ramnolípidos no contribuía significativamente a la migración de los LPMN in vivo hacia el pulmón. Sin embargo recientemente, otros autores (69) pudieron comprobar que los monoramnolípidos y los diramnolípidos secretados por P. aeruginosa reducen significativamente la fagocitosis de zimosán pre-opsonizado por macrófagos peritoneales. Idohou y col., en su estudio sobre el efecto de las lipoproteínas sobre el metabolismo oxidativo de LPMN, establecieron que estas moléculas no afectaban la producción de anión superóxido, pero inhibían la quimioluminiscencia de las células. La especulación de los autores acerca de estos resultados es que las lipoproteínas podrían interferir en el trans-

porte de electrones entre las especies reactivas del oxígeno y el luminol. También proponen que las diferencias en el efecto de las lipoproteínas sobre las funciones de LPMN se deberían a que la determinación de anión superóxido es más específica pero menos sensible que la determinación de quimioluminiscencia (47).

4.2. ROL DE LAS QUIMIOTACTINAS DE P. aeruginosa DURANTE EL DAÑO DE TEJIDO.

La liberación de especies reactivas del oxígeno por LPMN, inducidas por las fracciones de distinto peso molecular del SBCP, demostró que los componentes del SBCP pueden inducir el daño de tejido no sólo a través de la atracción de LPMN hacia el pulmón, sino que también pueden activar las células in situ. La potencia de las quimiotactinas para inducir estas funciones in vivo, es discutida, debido a que las concentraciones estimadas in vivo, son subóptimas para la liberación de las especies reactivas del oxígeno por LPMN. Sin embargo, para poder extrapolar los resultados obtenidos in vitro a un modelo in vivo o a lo que realmente ocurre en un huésped infectado, deben hacerse ciertas consideraciones. Es necesario tener en cuenta que durante una infección los factores de patogénesis bacterianos no actúan independientemente, sino en forma concomitante, activando o inhibiendo los mecanismos de defensa del huésped (123). La interacción entre todos estos factores resulta de difícil interpretación

cuando se desea realizar una evaluación conjunta.

Durante una infección los factores estimulantes adicionales provenientes del microorganismo infectante o del mismo huésped pueden inducir una respuesta exacerbada de las células fagocíticas activadas por factores quimiotácticos (150). El LPS es particularmente efectivo con respecto a esta función. La interacción entre el LPS, los péptidos quimiotácticos y los LPMN como inductores del daño de tejido pulmonar ha sido descrita por Worthen y col. (149). Estos péptidos inducen la liberación de especies reactivas del oxígeno por LPMN (94, 139). El LPS y los factores liberados por las plaquetas pueden actuar como pre-estimulantes, aumentando así la respuesta de LPMN estimulados por FMLP (150,-17). Los efectos del LPS de P. aeruginosa sobre las funciones de LPMN inducidas por FMLP han sido bien estudiadas por Kharazmi y col. (55) quien demostró la relevancia de la interacción entre estos dos componentes bacterianos. Además, la laminina, un componente de la matriz extracelular, incrementa la expresión de receptores para FMLP, lo cual resulta en el incremento de la liberación de anión superóxido por LPMN (97). La preincubación con TNF, además, induce la producción de oxidantes clorados por LPMN estimulados con FMLP (121).

Los efectos de la IL-1 sobre las funciones de los LPMN humanos in vitro son generalmente controversiales (101,137). Un trabajo reciente que caracteriza los receptores de IL-1 murinos y

humanos, sostiene el concepto de que la IL-1 esta involucrada en la regulación de las funciones de los LPMN (90). Los efectos de la IL-1-beta relacionados con la inflamación y la migración de células han sido estudiadas por otros autores que demostraron que esta citoquina actúa sobre las células endoteliales, aumentando su susceptibilidad al daño de tejido directo o indirecto (mediado por LPMN) (23,38). Butler y colaboradores han descripto recientemente en un sistema murino, que tanto la IL-1-alfa o la IL-1-beta recombinantes inducen cambios patológicos y una marcada infiltración de LPMN en los tejidos, produciendo un estado agudo letal semejante al shock séptico (14). Los resultados obtenidos en la presente investigación sugieren que la IL-1 estimula las funciones de los LPMN activados por las quimiotactinas de P. aeruginosa. Si bien los mecanismos interactivos entre PGs e IL-1 no han sido completamente dilucidados, se sabe que la PGE₂ inhibe la producción de IL-1 (60). El uso de un inhibidor de la ciclooxigenasa conduce a incrementar la producción de IL-1. El tratamiento con IL-1 parece proteger de las infecciones bacterianas a individuos granulocitopénicos, por mecanismos aún no dilucidados (89). Sin embargo la presencia de LPMN y altos niveles de IL-1 conducirían al daño de tejido, a traves de la exacerbación de las funciones de las células fagocíticas. Si bien los resultados no son concluyentes, estas evidencias indicarían que la interacción de los factores de patogenicidad de la bacteria en interacción con los mecanismos defensivos del huésped pueden conducir al daño del tejido pulmonar.

4.3. CONTROL FARMACOLOGICO DEL DAÑO DE TEJIDO PULMONAR.

La migración de las células fagocíticas desde la circulación hacia el pulmón es necesaria para la inactivación de P. aeruginosa (116). Una respuesta inflamatoria incrementada o acelerada puede, sin embargo, perjudicar al huésped y puede dejar serias secuelas en aquellos pacientes que se recuperan de una neumonía por P. aeruginosa. Los experimentos in vivo realizados en este trabajo demostraron que el antiinflamatorio inhibía los efectos deletéreos de la infección pulmonar por P. aeruginosa y sus factores quimiotácticos. Los resultados de este estudio permitieron comprobar que el tratamiento con DAINE modula la respuesta inflamatoria y disminuye el daño tisular, que se produce como consecuencia de la migración de los LPMN. Se demostró que, el tratamiento con piroxicam disminuía la migración de LPMN y MA hacia el pulmón. Estos hallazgos se correlacionaron con una mayor supervivencia de los animales. El tratamiento con piroxicam no afectó los mecanismos de defensa en contra de P. aeruginosa. También se demostró que el antiinflamatorio no tenía efecto directo sobre la bacteria.

La disminución de la migración de LPMN hacia el pulmón en el modelo murino de neumonía aguda por P. aeruginosa, puede explicar en parte el incremento de la supervivencia de los animales tratados con piroxicam. La disminución de la marginación de LPMN puede ser el resultado de cambios en la permeabilidad vascular, produci-

da por la inhibición de las PGs. A pesar que generalmente se acepta que la acción primaria de los DAINE es la inhibición de la ciclooxigenasa (32), otros mecanismos que contribuyen al efecto antiinflamatorio pueden actuar concomitantemente. La modulación farmacológica de la migración de LPMN y la liberación de especies reactivas del oxígeno (inducidas por por el péptido sintético FMLP, inmuno complejos u otros estímulos) mediante inhibidores de la ciclooxigenasa, ha sido estudiada por otros autores (51). La actividad regulatoria de las DAINE, in vivo e in vitro, varía de acuerdo al agente utilizado, su potencia farmacológica, y las diferentes funciones de los LPMN estudiadas. Péríanin ha demostrado que el flurbiproben, la indometacina y el ibuprofen inhiben la liberación de especies reactivas del oxígeno por LPMN (95, 96). De hecho, la supresión de la liberación de anión superóxido por LPMN fue demostrada en pacientes con artritis reumatoidea y tratados con piroxicam (133). En estos trabajos se estableció que el piroxicam no bloqueaba la producción de anión superóxido mediante la inhibición de la enzima NADPH-deshidrogenasa (81). Otros autores han demostrados que las DAINE inhiben algunas de las funciones de LPMN a través de la interacción ligando-receptor (81,112). Puede especularse que tal vez una unión reversible y labil de las DAINE con los receptores para FMLP, explicaría la reversión de la inhibición cuando las células fueron lavadas antes del ensayo de quimiotaxis.

En los experimentos realizados en este trabajo con células

pre-estimuladas con IL-1, se observó que el piroxicam inhibía las funciones de LPMN, independientemente de la acción estimuladora de la citoquina. Esta observación sería una evidencia de que el antiinflamatorio bloquea directamente la acción de los quimiotácticos, probablemente como se ha postulado previamente a través de la interacción con los receptores de los LPMN. El aumento de receptores de alta afinidad para FMLP inducido por la IL-1, podría explicar la inhibición parcial del antiinflamatorio sobre la liberación de especies reactivas del oxígeno.

A medida que se obtiene un mayor y mejor conocimiento sobre los complejos mecanismos de la injuria tisular, surgen también posibles formas farmacológicas de contrarrestarlos. Algunos de estos compuestos actúan selectivamente sobre algunas de las vías de inducción de injuria mientras que otros pueden tener más de una forma de acción, amplificando los efectos beneficios de su uso. Los antioxidantes surgen como promisorios agentes del control del daño de tejido debido a que los oxidante parecen ser un paso común en muchos de los mecanismos que conducen a la injuria pulmonar. Otros mecanismos incluyen la inhibición de la activación de las células inflamatorias y los moduladores endógenos de la inflamación y la injuria. El anión superóxido cumple un rol relevante en la defensa contra las infecciones pero también resultan agresivos contra las estructuras del órgano infectado. Sus propiedades pro-inflamatorias pueden atribuirse a su capacidad de degradar inmunoglobulinas desintegrar las membranas celu-

lares, aumentar la producción de LTB_4 y del factor $C5a$, entre otras funciones (141). Ha sido demostrado que la enzima SOD protege al organismo del efecto injurioso del anión superóxido, sin embargo esta enzima no se encuentra en concentraciones óptimas, durante los procesos inflamatorios, para controlar totalmente la producción de anión superóxido. El tratamiento con la enzima exógena podría tener efectos protectivos sobre el daño de tejido (147). Se comprobó que la concentración de cobre aumentan localmente durante un proceso inflamatorio (25). Este metal tiene la capacidad catalizar las reacciones de producción radicales libres y por consiguiente los agentes quelantes podrían tener efectos benéficos sobre los procesos inflamatorios. En trabajos previos se pudo demostrar que el piroxicam y otras DAINE forman quelatos con Cu^{2+} . Previamente algunos autores establecieron los beneficios de estos complejos con otras drogas (64). Si bien la capacidad de catalizar la dismutación del anión superóxido, es propiedad del Cu^{2+} , el piroxicam puede actuar como transportador del cobre existente en el organismo hacia el tejido inflamado. Esta afirmación permite sugerir un mecanismo protectoro aditivo de estas drogas.

A pesar de las numerosas investigaciones realizadas en los últimos años, la mayoría de los conocimientos sobre el control del daño de tejido pulmonar se encuentran en etapas experimentales. Sin embargo, los estudios a cerca de los mecanismos de acción y los resultados en animales de experimentación permite es-

peculiar a cerca del efecto benéfico de las DAINE conjuntamente con las terapias convencionales aplicadas tanto en pacientes con las funciones respiratorias comprometidas y en general, en aquellos que sufren un daño agudo del tejido pulmonar (129,135), inducido por agentes biológicos o químicos. La terapia con antiinflamatorios para la neumonía por P. aeruginosa ha sido evaluada en paciente con las funciones respiratorias comprometidas, tales como aquellos que sufren de fibrosis quística. Estos individuos sufren episodios de infección aguda, durante los cuales, el tratamiento con antibióticos es imperativo. Sin embargo, una vez superada la crisis, difícilmente los parámetros respiratorios retornan a la línea de base debido a las secuelas del daño de tejido. Los tratamientos con esteroides evaluados en estos pacientes, no han dado resultados totalmente exitosos, probablemente debido a sus efectos inmunosupresores. El tratamiento con DAINE mantiene intactas las defensas pulmonares contra la infección e inhibe la respuesta inflamatoria contra P. aeruginosa, disminuyendo así el daño de tejido. Esta última afirmación, conjuntamente con los demás hallazgos realizados en este trabajo de tesis, permiten postular la efectividad del tratamiento con DAINE durante la neumonía inducida por la infección por P. aeruginosa.

4.4. CONCLUSIONES FINALES

P. aeruginosa libera en cultivo una mezcla de sustancias

quimiotácticas para LPMN, con características peptídicas de bajo peso molecular; la contribución de estas sustancias a la actividad quimiotáctica del SBCP es predominante.

Las quimiotactinas activan a los LPMN para producir especies reactivas del oxígeno.

La respuesta funcional de los LPMN frente a las quimiotactinas bacterianas fue parcialmente incrementada por la preincubación de las células con IL-1.

La actividad quimiotáctica y la liberación de especies reactivas del oxígeno por los LPMN activados con las quimiotactinas bacterianas fueron parcialmente inhibidas por una DAINE.

La migración de los LPMN fue inducida en ratones por un aerosol de *P. aeruginosa*, de quimiotácticos bacterianos o del quimiotáctico sintético, FMLP.

La quimiotaxis de los LPMN, en el modelo murino, fue inhibida por el tratamiento con piroxicam.'

La mortalidad de los ratones en el modelo de neumonía inducido por *P. aeruginosa* fue disminuida, tanto por el tratamiento con piroxicam previo como por el tratamiento poste-

rior al desafío por aerosol.

4.5. FUTURO

Los resultados de este estudio ha demostrado indirectamente la composición del SBCP. En un futuro será necesario realizar la secuenciación de los componentes peptídicos aislados y realizar un estudio de unión ligando-receptor a fin de poder comprobar en forma directa si estos componentes activan a los LPMN a través de la unión a los receptores conocidos para FMLP.

En otro aspecto de la investigación, se deberán realizar los estudios necesarios para establecer un mejor control del daño de tejido pulmonar, durante la infección aguda pulmonar. La exacerbación inducida por la preincubación con IL-1 de las funciones bactericidas activadas por las quimiotactinas, de LPMN, deja abierta la interesante posibilidad de que el uso de inhibidor de esta citoquina podría contribuir conjuntamente con las DAINÉ a prevenir con mayor eficacia, el daño de tejido pulmonar.

A fin de evaluar la efectividad de las DAINÉ en el control del daño de tejido pulmonar durante la infección aguda pulmonar, será necesario realizar, en un futuro, estudios de investigación clínica. La aplicación de los hallazgos realizados en este trabajo, permitirá confirmar la utilidad del tratamiento con piroxi-

cam como terapia complementaria durante la neumonia inducida por
P. aeruginosa.

Resumen

Durante una infección por P. aeruginosa, la migración de las células fagocíticas desde la circulación hacia el pulmón es necesaria para la inactivación de la bacteria. Una respuesta inflamatoria incrementada o acelerada puede, sin embargo, perjudicar al huésped y puede dejar serias secuelas en aquellos pacientes que se recuperan de una neumonía por P. aeruginosa. Los productos de origen bacteriano con actividad quimiotáctica y quimiotáxigénica ha sido extensamente estudiados debido a su importancia como inductores de inflamación. A pesar que la acumulación de LPMN parece ser una de las mayores causas de la inducción de patogénesis durante la inflamación aguda, poco es lo que se conoce a cerca del efecto de los péptidos quimiotácticos bacterianos sobre los eventos fisiopatológicos que ocurren durante una infección por P. aeruginosa. En estudios previos de nuestro equipo se demostró que P. aeruginosa y S. aureus liberan quimiotactinas en cultivo, con capacidad de atraer LPMN.

En este trabajo se ha demostrado que P. aeruginosa libera en cultivo una mezcla de sustancias quimiotacticas para LPMN, con características peptídicas de bajo peso molecular; la contribución de estas sustancias a la actividad quimiotáctica del SBCP es predominante. Las quimiotactinas activan a los LPMN para producir especies reactivas del oxígeno. La respuesta funcional de los LPMN in vitro, frente a las quimiotactinas bacterianas fue parcialmente incrementada por la preincubación de las células con IL-1. La actividad quimiotáctica y la liberación de especies

reactivas del oxígeno por los LPMN activados con las quimiotactinas bacterianas in vitro, fueron parcialmente inhibidas por una DAINE.

Los estudios in vivo permitieron demostrar que la migración de los LPMN, puede ser inducida por un aerosol de P. aeruginosa, por los quimiotácticos bacterianos o un quimiotáctico sintético. La quimiotaxis de los LPMN, en el modelo murino, fue inhibida por el tratamiento con piroxicam. La mortalidad de los ratones, en el modelo de neumonía inducido por P. aeruginosa fue disminuída, tanto por el tratamiento con piroxicam previo como por el tratamiento posterior al desafío por aerosol. Los resultados obtenidos en los experimentos in vivo e in vitro permitieron conocer parte de los mecanismos del daño de tejido pulmonar inducido por LPMN durante la infección por P. aeruginosa. También se demostró la posibilidad de regular el proceso inflamatorio inducido por P. aeruginosa, mediante el tratamiento con DAINE. Estos hallazgos permiten considerar la aplicación clínica futura de estas drogas para controlar el daño de tejido pulmonar inducido durante la neumonía por P. aeruginosa.



Bibliografía

1. Abdallah MA, Pfestorf M, and Doring G. Pseudomonas aeruginosa pyoverdin: structure and function. *Antibiot Chemother*, Basel, Karger 42:8, 1989.
2. Abramson SB, and Weissman, G. The mechanisms of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum* 32:1, 1989.
3. Aduan RP, and Reynolds HY. The importance of cell-mediated responses to Pseudomonas infections. En: RG Dogget (Ed.): Pseudomonas aeruginosa, pp 135. Academic Press Inc, New York, 1979.
4. Allen RA, Traynor AE, Omann GM, and Jesaitis AJ. The chemotactic peptide receptor. A model for future understanding of chemotactic disorders. *Phagocytic Defects I: Abnormalities Outside of the Respiratory Burst. Hematol/ Oncol North Am* 2:33, 1988.
5. Andréasson S, Smith L, Andersen OK, Volden R, and Risberg B. Lysosomal enzyme pattern in lung lymph and blood during E. coli sepsis in sheep. *Scand J Clin Lab Invest* 47:355, 1987.
6. Andrews PC, and Krinsky NI. Human myeloperoxidase and hemimyeloperoxidase. In: G Di Sabato and Everse (Ed.), *Methods in Enzymology, Immunochemical Techniques*, part J, Phagocytosis and cell Mediated Cytotoxicity, Section V, Enzymes and Metabolic activity of Phagocytes. Academic Press, Orlando. 132:369, 1986.
7. Babior, BM. The respiratory burst oxidase. *Hematol/Oncol Clin North Am* 2:201, 1988.
8. Berend N. Inhibition of bleomycin lung toxicity by N-acetyl cysteine in the rat. *Pathology* 17:108, 1985.
9. Bishop MB, Baltch AL, Hill LA, Smith RP, Lutz F, and Pollack M. The effect of Pseudomonas aeruginosa cytotoxin and toxin A on human polymorphonuclear leukocytes. *J Med Microbiol* 24:315, 1987.
10. Bjorson AB, Knippenberg RW, and Bjornson HS. Non-steroidal anti-inflammatory drugs correct the bactericidal defect of

- polymorphonuclear leukocytes in guinea pig model of thermal injury. *J Infect Dis* 157:959, 1988.
11. Bodey GP, Bolívar R, Fainstein V, and Jadeja L. Infections cause by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 5:279, 1983.
 12. Boyd MR, Catignani GL, Sasame HA, Mitchell JR, and Stiko AW. Acute pulmonary injury in rats by nitrofurantoin and modification by vitamin E, dietary fat, and oxygen. *Am Rev Respir Dis* 120:93, 1979.
 13. Busse WW. Pathogenesis and sequelae of respiratory infections. *Rev Infect Dis* 13(suppl): S477, 1991.
 14. Butler LD, Layman NK, Cain RL, Riedl PE, Mohler KM, Bobbott JL, Belagajie R, Sharp J, and Bendele AM. Interleukin 1-induced pathophysiology: induction of cytokines, development of histopathologic changes, and immunopharmacologic intervention. *Clin Immun Immunopath* 53:400, 1989.
 15. Campbell EJ, Senior RM, and Elgus HG. Extracellular matrix injury during lung inflammation. *Chest* 92:161, 1987.
 16. Canning PC, and Neill JD. Isolation and characterization of interleukin-1 from bovine polymorphonuclear leukocytes. *J Leuk Biol* 45:21, 1989.
 17. Cardozo C, Edelman J, Jagirdar J, and Lesser M. Lipopolysaccharide-induced pulmonary vascular sequestration of polymorphonuclear leukocytes is complement independent. *Am Rev Respir Dis* 144:173, 1991.
 18. Cerquetti MC, Sordelli DO, Bellanti JA, and Morris Hooke A. Lung defenses against *Pseudomonas aeruginosa* in C5-deficient mice with different genetic backgrounds. *Infect Immun* 52: 853, 1986.
 19. Cox CD. Iron transport and serum resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother* 36:12, 1985.
 20. Cryz Jr SJ. *Pseudomonas aeruginosa* infections. En: R Ger-

manier (Ed.): Bacterial vaccines, pp 317. Academic Press Inc, Orlando, Florida, 1984.

21. Cryz SJ, Furer E, and Sadoff JC. A polyvalent Pseudomonas aeruginosa O-polysaccharide-toxin A conjugate vaccine. Antibiot Chemother, Basel, Karger 39:249, 1987.
22. Cryz SJ, Sadoff JC, Cross AS, and Furer E. Safety and immunogenicity of a polyvalent Pseudomonas aeruginosa O-polysaccharide-toxin A vaccine in humans. In: Pseudomonas aeruginosa infection, Antibiot Chemother. Basel, Karger 42:177, 1987.
23. Cybulsky MI, Chan MKW, and Movat HZ. Biology of disease. Acute inflammation and microthrombosis induced by endotoxin, interleukin-1, and tumor necrosis factor and their implication in gram-negative infection. Lab Invest 58:365, 1988.
24. Chadwick VS, Meller DM, Myers DB, Selden AC, Keshayarzian A, Broom MF, and Hobson CH. Production of peptides inducing chemotaxis in vitro and in vivo. Scand Gastroenterol 23: 121, 1988.
25. Dogan P, Soyuer U, and Tanrikulu. Superoxide dismutase and myeloperoxidase activity in polymorphonuclear leukocytes, and serum ceruloplasmin and copper levels, in psoriasis. B J Dermatol 120:239, 1989.
26. Dunn MM, Dunne M, and Kamp DW. Polymorphonuclear leukocyte- and P. aeruginosa-induced damage to human pulmonary epithelial cell line. J Infect Dis 162:172, 1990.
27. Feller I, and Pierson C. Pseudomonas vaccine and hyperimmune plasma of burned patients. Arch Surg 97:225, 1968.
28. Ferrante A, Nandoskar M, Bates EJ, and Goh DHB. Staphylococcus aureus-estimated human mononuclear leucocyte conditioned medium augments the basal and stimuli-induced neutrophil respiratory burst and degranulation. Immunology 60: 431, 1987.
29. Ferrante A, Nandoskar M, Walz A, Goh DHB, and Kowansko IC. Effects of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1

- alpha and beta on human neutrophil migration, respiratory burst and degranulation. *Int Archs Allergy Appl Immun* 86: 82, 1988.
30. Fick RB, and Hata JS. Pathogenic mechanisms in lung diseases caused by Pseudomonas aeruginosa. *Chest* 95(suppl):206, 1989.
 31. Gadow EC, Garibaldi AB, Lippold SE, and Sordelli DO. Anomalías del cierre del tubo neural. Cuantificación de macrófagos en líquido amniótico. Resúmenes del IV Congreso Latinoamericano de Genética. Mendoza, Argentina, 21-27 de setiembre, 1979.
 32. Goodwin JS. Are prostaglandins proinflammatory, antiinflammatory, both or neither?. *J Rheumatol* 18:26, 1991.
 33. Green GM, Jakab GJ, Low RB, and Davis GS. Defense mechanisms of the respiratory membrane. *Am Rev Resp Dis* 115:479, 1977.
 34. Grotendorst GR. Spectrophotometric assay for the quantitation of cell migration in the Boyden chamber chemotaxis assay. *Methods Enzymol* 147:145, 1987.
 35. Hales CA, Branstetter RD, Neely CF, Peterson MB, Kong D, and Watkins MD. Methyprednisolone on circulating eicosanoids and vasomotor tone after endotoxin. *J Appl Physiol* 60:1386, 1986.
 36. Hannesian S, Regan W, and Watson P. Isolation and characterization of antigenic components of a new heptavalent Pseudomonas vaccine. *Nature* 229:209, 1971.
 37. Harvath L, Falk W, and Leonard EJ. Rapid quantitation of neutrophil chemotaxis: use of polyvinylpyrrolidone-free membrane in a multi-well assembly. *J Immunol Methods* 37:39, 1980.
 38. Heidel JR, Sassenfeld HM, Maliszewski CR, Silflow RM, Baker PE, Taylor SM, and Leid RW. Functional studies of bovine alveolar neutrophils elicited with recombinant bovine IL-1 beta. *J Immun* 144:1037, 1990.

39. Henderson Jr WR. Eicosanoids and lung inflammation. Am Rev Respir Dis 135:1176, 1987.
40. Henson PM, and Johnston Jr RB. Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. J Clin Invest 79:669, 1987.
41. Higgs GA. Arachidonic acid metabolism in leukocytes. In: Phagocytosis, past and future. M Karnovsky and L Bolis (Ed.) Academic Press, New York, NY, 1982.
42. Hirs, CHW. Separation of Peptides. Methods in Enzymology. CHW Hirs (Ed.) Acad. Press 2:361, 1967.
43. Hoiby N. The management of Pseudomonas chest infections. The way forward. In: Cystic fibrosis: horizons. Proceedings of the 9th International Cystic Fibrosis Congress. D Lawson (Ed.) Brighton, England, 1984.
44. Horvat RB, and Parmely, MJ. Pseudomonas aeruginosa alkaline protease degrades human gamma interferon and inhibits its bioactivity. Infect Immun 56:2925, 1988.
45. Huang NN, and Dogget RG. Antibiotic therapy of Pseudomonas infection in patients with cystic fibrosis. En: Pseudomonas aeruginosa, pp 411. RG Dogget (Ed.) Academic Press Inc New York, 1979.
46. Hughes V, Humphreys JM, and Edwards SW. Protein synthesis is activated in primed neutrophil: a possible role in inflammation. Biol Rep 7:881, 1987.
47. Idohou N, Couderc R, Roch-Arveiller M, Bonneau C, Giroud JP, and Raichvarg D. In vitro modulating effect of human very-low-density lipoproteins on human polymorphonuclear leukocyte oxidative metabolism and migration. J Leuk Biol 50:1, 1991.
48. Jackson JH, White CW, McMurtry IF, Berger EM, and Repine JE. Dimethylthiourea decreases acute lung edema in phorbol myristate acetate-treated rabbits. J Appl Physiol 61:353, 1986.

49. Jackson JH, and Cochrane ChG. Leukocyte-induced tissue injury. *Hematol/Oncol Clin North Am* 2:317, 1988.
50. Jacob HS, Moldow CF, Flinn PJ, Weisdorf DJ, Vercellotti GM, and Hammerschmidt DE. Therapeutic ramifications of the interaction of complement, granulocytes and platelets in the production of acute lung injury. *Ann NY Acad Sci* 384:489, 1982.
51. Jenkins JK, Carey PD, Byrne K, Sugerman HJ, and Fowler III AA. Sepsis-induced lung injury and the effects of ibuprofen pretreatment. Analysis of early alveolar events via repetitive bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 143:155, 1991.
52. Kaltreider HB. Expression of immune mechanisms in the lung. *Am Rev Respir Dis* 113:347, 1976.
53. Kermode JC, Muthukumaraswamy N, and Freer RJ. Characteristics of binding of a potent chemotactic formyl tetrapeptide, formylmethionyl-leucyl-phenylalanyl-phenylalanine, to the receptors on rabbit neutrophils. *J Leuk Biol* 43:420, 1988.
54. Kharazmi A, Schiøtz PO, Hoiby N, Baek L, and Doring G. Demonstration of neutrophil chemotactic activity in the sputum of cystic fibrosis patients with Pseudomonas aeruginosa infection. *Eur J Clin Invest* 16:143, 1986.
55. Kharazmi A, Fomsgaard A, Conrad RS, Galanos C, and Hoiby N. Relationship between chemical composition and biological function of Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide: effect on human neutrophil chemotaxis and oxidative burst. *J Leuk Biol* 49:15, 1991.
56. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med* 93:480, 1980.
57. Killian M, Reinholdt, and Mortensen SB. Perturbation of mucosal immune defence mechanisms by bacterial IgA proteases. *Bull Eur Physiopath Respir* 19:99, 1983.
58. Konstan MW, Vargo KM, and Davis PB. Ibuprofen attenuates the inflammatory response to Pseudomonas aeruginosa in a rat

- model of chronic pulmonary infection. Implications for anti-inflammatory therapy in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 141:186, 1990.
59. Krauser KH, and Lew DP. Bacterial toxins and neutrophil activation. *Sem Hematol* 25:112, 1988.
 60. Kunkel SL, Remick DG, Spengler M, and Chensue SW. Modulation of macrophages-derived interleukin-1 and tumor necrosis factor by prostaglandin E₂. *Adv Prostaglan Thromb Leukotr Res* 17:155, 1987.
 61. Kusaka Y, and Donaldson K. Production of interleukin-1 like activity by neutrophil derived from rat lung. *Thorax* 45: 281, 1990.
 62. Larsen GL, Parrish DA, and Henson PM. Lung Defense. The paradox of inflammation. *Chest* 83:1s, 1983.
 63. Lengfelder E, and Weser U. Superoxide dismutation by low molecular weight Cu-complexes. *Bull Eur Physiopath Resp* 17(suppl):73, 1981.
 64. Lengfelder E. Can anti-inflammatory drugs act as scavengers of oxygen radicals? *Agents & Actions* 15:56, 1984.
 65. Lewis RE, Miller RA, and Granger HJ. Acute microvascular effects of the chemotactic peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine: comparisons with leukotriene B₄. *Microvasc Res* 37:53, 1989.
 66. Light, B. Respiratory infections. In *Pathophysiology of respiration*. MH Kryger (Ed.), Wiley Medical Publication. 15:279, 1981.
 67. Luce JM, Montgomery AB, Marks JD, Turner J, Metz CA, and Murray JF. Ineffectiveness of high dose methylprednisolone in preventing parenchymal lung injury and improving mortality in patients with septic shock. *Am Rev Respir Dis* 138:62, 1988.
 68. Lunec J, Griffith HR, and Blake DR. Oxygen radicals in

- inflammation. *Pharmacology* 1:45, 1987.
69. Mc Clure CD, and Schiller NL. Inhibition of macrophage phagocytosis by bacterial glycolipids. *J Leuk Biol* 2(suppl):1, 1991.
 70. Marasco WA, Phan SH, Krutzch H, Showell HJ, Feltner DE, Nairn R, Becker EL, and Ward PA. Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by Echerichia coli. *J Biol Chem* 259:5430, 1984.
 71. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, and Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in lipoprotein samples. *Anal Biol* 87:206, 1978.
 72. Mason MJ, and Van Epps DE. In vivo neutrophil emigration response to interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J Leuk Biol* 45:62, 1989.
 73. Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM, and Root RK. Preparation of cells and materials for functional assays. In: *Laboratory Manual of Neutrophil Function*. Raven Press, New York, USA. 1:2, 1986.
 74. Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM, and Root RK. Preparation of cells and materials for functional assays. In: *Laboratory Manual of Neutrophil Function*. Raven Press, New York, USA. 1:2, 1986.
 75. Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM, and Root RK. Preparation of cells and materials for functional assays. In: *Laboratory Manual of Neutrophil Function*. Raven Press, New York, USA. 1:2, 1986.
 76. Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM and Root RK. Function related to microbicidal activity. Superoxide production. In: *Laboratory Manual of Neutrophil Function*. Raven Press, New York, USA. 5:109, 1986.
 77. Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM and Root RK. Function related to microbicidal activity. Hydrogen peroxide production. In: *Laboratory Manual of Neutrophil Function*. Raven

Press, New York, USA. 5:118, 1986.

78. Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM and Root, RK. Function related to microbicidal activity. Chemiluminescence. In: Laboratory Manual of Neutrophil Function. Raven Press, New York, USA. 5:103, 1986.
79. Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM, and Root RK. Function related to microbicidal activity. SOD. In: Laboratory Manual of Neutrophil Function. Raven Press, New York, USA. 5:116, 1986.
80. Miller JA, Spilsbury JF, and Jones RJ. A new polyvalent Pseudomonas vaccine. J Med Microbiol 10:19, 1977.
81. Minta JO, and Williams MD. Some nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the generation of superoxide anions by activated polymorphs by blocking ligand-receptor interactions. J Rheumatol 12:751, 1985.
82. Misfeldt ML, Legaard PK, Howell SE, Fornella MH, and Legrand RD. Induction of interleukin-1 from murine peritoneal macrophages by Pseudomonas aeruginosa exotoxina A. Infect Immun 58:978, 1990.
83. Morikage T, Mizushima Y, Sakamoto K, and Yano S. Prevention of fatal infections by recombinant human interleukin 1 alpha in normal and anticancer drug-treated mice. Cancer Res 50: 2099, 1990.
84. Morris Hooke A, Arroyo PJ, and Oeschger MP. Temperature-sensitive mutants of P. aeruginosa: isolation and preliminary immunological evaluation. Infect Immun 38:136, 1982.
85. Morris Hooke A, Sordelli DO, Cerquetti MC, and Vogt AJ. Quantitative determination of bacterial replication in vivo. Infect Immun 49:424, 1985.
86. Mylan PR, and Glauser MP. Role of complement-derived and bacterial formylpeptide chemotactic factors in the in vivo migration of neutrophils experimental Escherichia coli pyelonephritis in rats. J Infect Dis 159:959, 1989.

87. Neal TM, Vissers MC, and Winterbourn ChC. Inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs of superoxide production and granule enzyme release by polymorphonuclear leukocytes stimulated with immune complexes or formil-methionil-leucyl-phenylalanine. *Biochem Pharm* 36:2511, 1987.
88. Nicotra J, Orsini AJ, and De Bari VA. Chemiluminescence response of the human polymorphonuclear neutrophil to lipopolysaccharides. *Cell Biophysics* 7:283, 1985.
89. Ozaki Y, Ohashi T, Minami A, and Nakamura S. Enhanced resistance of mice to bacterial infection induced by recombinant human interleukin-1 alpha. *Infect Immun* 55:1436, 1987.
90. Parker KP, Benjamin WR, Kaffka KL, and Kilian PL. Presence of Il-1 receptors on human and murine neutrophils. Relevance to Il-1-mediated effects in inflammation. *J Immunol* 142:537, 1989.
91. Paur E, and Lengfelder E. Can copper piroxicam complexes catalyze the elimination of superoxide radicals? *Fresenius Z Anal Chem* 317:693, 1984.
92. Pennigton JE, and Small GJ. Passive immune therapy for experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in the neutropenic host. *J Infect Dis* 155:973, 1987.
93. Périanin A, Giroud JP, and Hakim J. Nonsteroidal antiinflammatory drug as tools for analysis of neutrophil functions. *Biomed Pharmacother* 41:315, 1987.
94. Périanin A, Gougerot-Pocidallo MA, Giroud JP, and Hakim J. Diclofenac binding to human polymorphonuclear neutrophils: effect on respiratory burst and N-formylated peptidebinding. *Bioche Pharmacol* 36:2609, 1987.
95. Périanin A, Giroud JP, and Hakim J. Differential in vivo effects of Indomethacin, Ibuprofen, and Fluriprofen on oxygen-dependent killing activities of neutrophils elicited by acute nonimmune inflammation in the rat. *Inflammation* 12: 181, 1988.

96. Périanin A, Gaudry M, Marquetty C, Giroud JP, and Hakim J. Protective effect of indometacin against chemotactic deactivation of human neutrophils induced by formylated peptide. *Biochem Pharmacol* 37:1693, 1988.
97. Pike MC, Wicha MS, Yoon P, Mayo L, and Boxer LA. Laminin promotes the oxidative burst in human neutrophils via increased chemoattractant receptor expression. *J Immunol* 142:2004, 1989.
98. Pivetta OH, Sordelli DO, and Labal ML. Pulmonary clearance of Staphylococcus aureus in mutant mice with some hereditary alterations resembling cystic fibrosis. *Pediat Res* 11:1133, 1977.
99. Pivetta OH, Cassino RJJ, and Sordelli DO. Pulmonary cell response to bacterial challenge in mutant mice with some hereditary alterations resembling cystic fibrosis. *Life Sci* 26:1349, 1980.
100. Raghoobar M, Van den Berg WB, and Ginneken CAM. Mechanisms of cell association of some nonsteroidal anti-inflammatory drugs with isolated leucocytes. *Biochem Pharm* 37:1245, 1988.
101. Rampart M, Fiers W, De Smet W, and Herman AG. Different pro-inflammatory profiles of interleukin 1 (IL) and tumor necrosis factor (TNF) in an in vivo model of inflammation. *Agents Action* 26: 186-188, 1989.
102. Ras GJ, Anderson R, Taylor GW, Savage JE, Van Niekerk E, Wilson R, and Cole PJ. Proinflammatory interactions of pyocyanin and 1-hydroxyphenazine with human neutrophils in vitro. *J Infect Dis* 162:178, 1990.
103. Repine JE. Twenty-fifth Aspen Lung Conference: lung defense, injury and repair. *Chest* 83:1s, 1983.
104. Reynolds HY. Pulmonary host defenses. *Chest* 95(3):223S, 1989.
105. Roch-Arveiller M, Pham-Huy D, Muntaner O, Maman L, and Giroud JP. Drug activity "in vitro" and "in vivo" on leuko-

- cyte chemotaxis. Biomed Pharmacother 41:321, 1987.
106. Rodríguez V, and Bodey GP. Epidemiology, clinical manifestations, and treatment in cancer patients. En: Pseudomonas aeruginosa, pp 368. RG Dogget (Ed.) Academic Press Inc, New York, 1979.
 107. Rollet R, Soloaga R, Mora J, Litterio M, Vellani C, Velasquez J, and Marino RD. Bacilos gram negativos no fermentadores en el hospital F.J. Muñiz. V^o Congreso Argentino de Microbiología. Asociación Argentina de Microbiología. Mar del Plata, Argentina, noviembre de 1988.
 108. Rosenbaum RM, Cheli CD, and Gerritsen ME. Dexamethasone inhibits prostaglandin release from rabbits coronary microvessel endothelium. Am J Physiol 250:C970, 1986.
 109. Rot A, Henderson LE, Sowder R, and Leonard EJ. Staphylococcus aureus tetrapeptide with high chemotactic potency and efficacy for human leukocytes. J Leuk Biol 45:114, 1989.
 110. Said SI, and Foda HD. Pharmacologic modulation of lung injury. Am Rev Respir Dis 139:1553, 1989.
 111. Schiffmann E, Showell HV, Corcoran BA, Ward PA, Smith E, and Becker EL. The isolation and partial characterization of neutrophil chemotactic factors from Escherichia coli. J Immunol 114:1831, 1975.
 112. Shelly J, and Hoff SF. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on isolated human polymorphonuclear leukocytes (PMN): chemotaxis, superoxide production, degranulation and N-formyl-l-methionyl-l-leucyl-l-phenylalanine (FMLP) receptor binding. Gen Pharmac 20:329, 1989.
 113. Shryock TR, Silver SA, Banschbach MW, and Kramer JS. Effect of Pseudomonas aeruginosa rhamnolipid on human neutrophil migration. Current Microbiol 10:323, 1984.
 114. Snyderman R. Regulatory mechanisms of a chemoattractant receptor on human polymorphonuclear leukocytes. Rev Infect Dis 7:390, 1985.

115. Sordelli DO, Cerquetti MC, Morris Hooke A, and Bellanti JA. Enhancement of Pseudomonas aeruginosa lung clearance after local immunization with a temperature-sensitive mutant. *Infect Immun* 39:1275, 1983.
116. Sordelli DO, Zeligs BJ, Cerquetti MC, Morris Hooke A, and Bellanti JA. Inflammatory responses to Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus in the murine lung. *Eur J Respir Dis* 66:31, 1985.
117. Sordelli DO, Cerquetti MC, Morris Hooke A, and Bellanti JA. The effect of chemotactins released by Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa on the murine respiratory tract. *Infect Immun* 49:26, 1985.
118. Sordelli DO, Cerquetti MC, and Morris Hooke A. Replication rate of Pseudomonas aeruginosa in the murine lung. *Infect Immun* 50:388, 1985.
119. Sordelli DO, Cerquetti MC, El-Tawil G, Ramwell PW, Morris Hooke A and Bellanti JA. Ibuprofen modifies the inflammatory response of the murine lungs to Pseudomonas aeruginosa. *Eur J Respir Dis* 67:118, 1985.
120. Sordelli DO, Degnan PJ, and Cerquetti MC. Piroxicam modulates the recruitment of phagocyte cells produced by Pseudomonas aeruginosa in the murine lung. 86th Annual Meeting of the Am Soc Microbiol. Washington, DC, USA, March 1986.
121. Steinbeck MJ, and Roth JA. Neutrophil activation by recombinant cytokines. *Rev Infect Dis* 11:549, 1989.
122. Sthal, E. Thin Layer Chromatography, Laboratory Handbook, pp.485, Acad. Press, 1962.
123. Stiver HG, Zachidniak K, and Speert DP. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis by the mucoid exopolysaccharide of P. aeruginosa. *Clin Invest Med* 11:247, 1988.
124. Strieter RM, Kunkel SL, Showell HJ, Remick DG, Phan SH, Ward PA, and Marks RM. Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1-beta. *Science* 243:1467, 1989.

125. Styrt B. Species variation in neutrophil biochemistry and function. *J Leuk Biol* 46:63, 1989.
126. Sullivan GW, Carper HT, Sullivan JA, Murata T, and Mandell GL. Both recombinant interleukin-1 (beta) and purified human monocyte interleukin-1 prime human neutrophils for increased oxidative activity and promote neutrophil spreading. *J Leuk Biol* 45:389, 1989.
127. Suter S, Schaad UB, Roux L, Nydegger UE, and Waldvogel FA. Granulocyte neutral proteases and *Pseudomonas* elastase as a possible causes of airway damage in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 149:523, 1984.
128. Tainer JA, Turner JE, and Lynn WS. New aspects of chemotaxis. Specific target cell attraction by lipid and lipoprotein factors of *Escherichia coli* chemotactic factor. *Am J Pathol* 81:401, 1975.
129. Tate RM, and Repine JE. Neutrophil and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 128:552, 1983.
130. Tomashefski Jr JF, Vawter GF, and Reid L. Pulmonary pathology. In: A textbook for pediatricians and physicians, pp 31. AP Norman and JC Baltern (Ed.) Balliere Tindall, London, 1983.
131. Van Benthuyzen K, Shasby D, Tate R, Repine JE, and McMurtry I. Inhibitors of arachidonic acid metabolism prevent neutrophil-dependent acute lung injury in isolated perfused rabbit lungs. *Chest* 81(suppl):S60, 1982.
132. Vane, J. The evolution of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their mechanisms of action. *Drugs* 33(suppl):18, 1987.
133. Van Epps DE, Greiwe S, Potter J, and Goodwin J. Alterations in neutrophil superoxide production following piroxicam therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Inflammation* 11:59, 1987.
134. Vasil ML. *P. aeruginosa*: Biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J Pediatr* 108:800, 1986.

135. Utsonomiya T, Krausz MM, Dunham B, Valeri CR, Levine L, Shepro D, and Hechtman HB. Modification of inflammatory response to aspiration by ibuprofen. *Am J Physiol* 243:903, 1982.
136. Walker BAM, Hagenlocker BE, and Ward PA. Superoxide responses to formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in primed neutrophil. Role of intracellular and extracellular calcium. *J Immunol* 146:3124, 1991.
137. Wankowicz Z, Megyeri P, and Issekutz A. Synergy between tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in the induction of polymorphonuclear leukocyte migration during inflammation. *J Leuk Biol* 43:349, 1988.
138. Ward PA, Lepow IH, and Newman LJ. Bacterial factors for polymorphonuclear leukocytes. *Am J Pathol* 52:725, 1968.
139. Ward PA, Till GO, and Beauchamp C. Evidence for role of hydroxyl radical in complement and neutrophil-dependent tissue injury. *J Clin Invest* 72:789, 1983.
140. Ward PA, and Kunkel SL. Bacterial virulence and the inflammatory system. *Rev Infect Dis* 5(suppl):793, 1983.
141. Ward PA, Warren JS, and Johnson KJ. Oxygen radicals, inflammation, and tissue injury. *Free Rad Med* 5:403, 1988.
142. Ward PA, and Varani J. Mechanisms of neutrophil-mediated killing of endothelial cells. *J Leuk Biol* 48:97, 1990.
143. Weiss SJ, and Lo Buglio AF. Biology of disease: phagocyte generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest* 47:5, 1982.
144. Weissman G. Prostaglandins in acute inflammation. *Current Concepts (The Upjohn Company):5*, 1980.
145. Weser U, Lengfelder E, Sellinger KH, and Schobotz L. Reactivity of chelated copper with superoxide. In *Inflammatory Diseases and Copper*, Sorenson JRJ (Ed). Clifton: Humana Press, p. 513, 1982.

146. Wilkinson PC. Leukocyte locomotion and chemotaxis: effects of bacteria and viruses. *Rev Infect Dis* 2:293, 1980.
147. Winkler T. Treatment of inflammatory disorders with SOD. In: Free radicals and arthritic diseases. Swaak AJG and Koster JF (Ed.) pp 129, 1986.
148. Woods DE, and Sokol PA. Role of *P. aeruginosa* extracellular enzymes in lung disease. *Clin Invest Med* 9:108, 1986.
149. Worthen GS, Haslett C, Rees AJ, Gumbay RS, Henson JE, and Henson PM. Neutrophil-mediated pulmonary vascular injury. Synergistic effect of trace amounts of lipopolysaccharide and neutrophil stimuli on vascular permeability and neutrophil sequestration in the lung. *Am Rev Respir Dis* 136:19, 1987.
150. Wright GG, Read PW, and Mandell GL. Lipopolysaccharide releases a priming substance from platelets that augments the oxidative response of polymorphonuclear neutrophils to chemotactic peptide. *J Infect Dis* 157:690, 1988.
151. Youmans GP. Lower respiratory tract infection: general consideration. In the biological and clinical basis of infectious diseases. Youmans GP, Paterson PY, and Sommers HM (Ed). WB Saunders Company. 24:288, 1985.